



**Maria Inês Gomes Silva**

Licenciatura em Engenharia Biomédica

## **Criação de *software* para análise do batimento ciliar em peixe-zebra**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: Doutora Carla Quintão, Professora auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientadores: Doutora Susana Lopes, Investigadora principal, CEDOC, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutor Mário António Basto Forjaz Secca, Professor Associado da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Vogais: Doutor José Manuel Matos Ribeiro da Fonseca, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Doutora Carla Maria Quintão Pereira, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro de 2014**



**Criação de *software* para análise do batimento ciliar em peixe-zebra** Copyright © Maria Inês Gomes Silva, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*Para o meu irmão, que não podia tocar no portátil enquanto os programas estavam a correr.*



# **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer às minhas coordenadoras, a Professora Carla Quintão e Susana Lopes pelo apoio e entusiasmo que me deram neste trabalho. À equipa do CEDOC@ICG pela disponibilidade, ajuda e paciência quando foi necessário. À família e amigos por me aturarem e apoiarem sempre.





# Resumo

---

O peixe-zebra é utilizado como modelo vertebrado para estudos *in vivo* de diversas patologias de origem genética. Neste trabalho pretendeu-se estudar a discinesia ciliar primária através do estudo *in vivo* do organizador da esquerda-direita destes peixes, conhecido por vesícula de Kupffer. Em particular, após análise de sequências de imagens captadas a alta velocidade, avaliou-se o comportamento dinâmico de cílios normais e comparou-se com o de cílios com alterações genéticas com o objectivo de melhor compreender os processos que influenciam a localização assimétrica dos órgãos internos, associados a esta doença.

De vídeos obtidos por microscopia de alta velocidade do interior da vesícula de Kupffer foram analisados 32 cílios, sendo 8 normais e os restantes cílios pertencentes a três alterações genéticas diferentes: subexpressão de *Pkd2*, sobreexpressão de *Arl13b* e mutação no gene *deltaD*. Para cada cílio calculou-se a frequência de batimento e caracterizou-se quantitativamente o movimento. Esta última análise teve como base a segmentação manual do cílio em quatro pontos definindo a base, o meio e a ponta. De seguida, estudou-se a dinâmica de cada uma das rectas constituídas por estas três estruturas ao longo do tempo. Com recurso à análise estatística ANOVA podemos comprovar diferenças no movimento entre os cílios alterados quando comparados com os normais.

A análise da frequência demonstrou que todos os cílios estudados possuem uma frequência média 34,9 Hz. Demonstrou-se ainda que, quando comparados com cílios normais, os cílios *Pkd2* possuem um movimento 60% mais rígido, os *Arl13b* são caracterizados por amplitudes angulares 26% superiores no seu movimento e, por fim, a relação entre as amplitudes base/meio é 23% superior nos cílios *Delta D*.

Para implementar estes estudos, desenvolveu-se uma ferramenta baseada num *plugin* para *ImageJ* conjuntamente com códigos em R, que poderá vir a ser utilizada em investigações da discinesia ciliar primária em peixes-zebra.

**Palavras-chave:** Cílios, Peixes-zebra, Discinesia Ciliar Primária, Assimetria, Genética.



# Abstract

---

The zebra fish is used as a vertebrate model for *in vivo* studies of several pathologies with genetic origin. In this work we aimed to study primary ciliary dyskinesia through samples of *in vivo* cilia existing in the Kupffer vesicle. In particular, after the analysis of image sequences captured in high-speed, we evaluated the dynamic behaviour of normal cilia and genetically altered cilia, with the goal of better understanding the process that influence the asymmetric location of internal organ associated with this disease.

Videos obtained using high-speed microscopy from inside the Kupffer vesicle were analysed and from them 32 cilia were studied. From this sample, 8 cilia were normal and the others were from 3 different genetic alterations: subexpression of *Pkd2*, overexpression of *Arl13b* and *deltaD* mutation. For each cilium the beat frequency and the movement dynamic are analysed. This last study is based on the manual segmentation of structure using four different points defining the base, the mid and the tip of the cilium. Then, the dynamic of each slope defined by these three structures is studied overtime. Using ANOVA statistical analysis we managed to verify differences between the movement of normal cilia and altered cilia.

The cilia beat frequency analysis has shown that the studied cilia had an average frequency of 34,9 Hz. It's was also demonstrated that when compared to normal cilia, the *Pkd2* cilia have a movement 60% stiffer, the *Arl13b* have angular amplitudes 30% greater and *DeltaD* have a base-mid amplitude ratio 23% superior.

To implement these studies, it was developed a tool based on a *plugin* for *ImageJ* along with R codes which ought be used for future investigations of primary ciliary dyskinesia in zebrafish.

**Keywords:** Cilia, Zebra fish, Primary Ciliary Dyskinesia, Asymmetry, Genetic.



# ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS .....	1
2.	ENQUADRAMENTO TEÓRICO E ESTADO DA ARTE .....	3
2.1	ESTRUTURA CILIAR.....	3
2.2	REGULAÇÃO DO BATIMENTO CILIAR .....	7
2.3	INTRODUÇÃO AO PROCESSAMENTO DE IMAGEM.....	8
2.4	TRANSFORMADA DE FOURIER .....	11
2.5	TRANSFORMADA DE HILBERT .....	15
2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA: ANOVA A UM FACTOR .....	19
2.7	IMPORTÂNCIA DA CARACTERIZAÇÃO DO BATIMENTO CILIAR EM PEIXES-ZEBRA .....	21
2.8	ESTADO DA ARTE .....	23
3.	PROCESSAMENTO DE IMAGEM .....	25
3.1	PRÉ-PROCESSAMENTO GERAL.....	25
3.2	PROCESSAMENTO DE IMAGEM PARA A CARACTERIZAÇÃO DO MOVIMENTO CILIAR .....	26
4.	PROCESSAMENTO DE DADOS .....	33
4.1	CRIAÇÃO DE UM PLUGIN PARA IMAGEJ .....	33
4.2	CÁLCULO DAS FREQUÊNCIAS CILIARES.....	34
4.2.1.	<i>Plugin - Aquisição de dados para o cálculo da frequência.....</i>	<i>35</i>
4.2.2.	<i>Código R - Cálculo da frequência de um único píxel.....</i>	<i>36</i>
4.2.3.	<i>Código R - Cálculo da frequência para vários píxeis.....</i>	<i>38</i>
4.2.4.	<i>Código R - Estudo da diferença de fase entre cílios .....</i>	<i>39</i>
4.3	CARACTERIZAÇÃO DO MOVIMENTO CILIAR .....	42
4.3.1.	<i>Aquisição de dados para a caracterização do movimento.....</i>	<i>42</i>
4.1.1.	<i>Código R - Organização do código.....</i>	<i>43</i>
4.1.2.	<i>Código R - Algoritmo .....</i>	<i>43</i>
4.1.3.	<i>Análise Estatística .....</i>	<i>47</i>
5.	RESULTADOS.....	49
5.1	AMOSTRA .....	49
5.2	FREQUÊNCIA .....	50
5.3	MOVIMENTO CILIAR.....	51
6.	CONCLUSÕES.....	59

Bibliografia.....	61
ANEXOS .....	65
ANEXO I    PROTOCOLO .....	65
ANEXO II    RESULTADOS: FREQUÊNCIAS .....	75
ANEXO III    RESULTADOS: VALORES DO MOVIMENTO CILIAR .....	76
ANEXO IV    RESULTADOS: ANOVA .....	84

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> - Estrutura de um cílio móvel .....	4
<b>Figura 2.2</b> - Estrutura da dineína simplificada .....	5
<b>Figura 2.3</b> - Aplicação de um filtro gaussiano.....	8
<b>Figura 2.4</b> - Exemplo da segmentação utilizando a binarização Otsu de objectos..	9
<b>Figura 2.5</b> - Histograma de uma imagem.....	10
<b>Figura 2.6</b> - Exemplo de esqueletização.....	10
<b>Figura 2.7</b> - Representação gráfica de $Y(k)$ ..	13
<b>Figura 2.8</b> - Exemplo da Transformada de Fourier de um sinal $f(t)$ .....	14
<b>Figura 2.9</b> - Transformada de Hilbert do sinal $f(t)=\sin(\pi t)$ . .....	16
<b>Figura 2.10</b> - Fase ao longo do tempo de $f(t)$ ..	17
<b>Figura 2.11</b> - Diferença de fase ao longo do tempo entre $f_1(t)$ e $f_2(t)$ . .....	18
<b>Figura 2.12</b> - Peixe-zebra adulto.....	21
<b>Figura 2.13</b> - Estágios do embrião do peixe-zebra e algumas das estruturas observáveis. ....	21
<b>Figura 2.14</b> - Cílios de peixe-zebra na vesícula de Kupffer. ....	22
<b>Figura 2.15</b> - Quimógrafo de um cílio normal. ....	24
<b>Figura 2.16</b> - Quimógrafo de um cílio <i>wobbling</i> .....	24
<b>Figura 3.1</b> - Esquema do processo de tratamento de imagem. ....	26
<b>Figura 3.2</b> - Processamento antigo para a aquisição dos dados para a caracterização do movimento ciliar. ....	27
<b>Figura 3.3</b> - Exemplo de um cílio $f(x,y)$ . ....	28
<b>Figura 3.4</b> - Dois exemplos de problemas com a binarização. ....	29
<b>Figura 3.5</b> - Rotação de um cílio. ....	30
<b>Figura 3.6</b> - Exemplo da aplicação da binarização à imagem com os pontos marcados a preto e posterior esqueletização. ....	31

<b>Figura 3.7</b> – Esquema do processamento para a aquisição do movimento ciliar. .	31
<b>Figura 4.1 A</b> – Interface inicial para a inserção da taxa de aquisição do vídeo .....	34
<b>Figura 4.1 B</b> – Interface do <i>plugin</i> .....	34
<b>Figura 4.2</b> – Janelas obtidas ao efectuar a recolha de intensidades para um píxel.	35
<b>Figura 4.3</b> – Exemplo de análise a um píxel: FFT .....	37
<b>Figura 4.4</b> – Exemplo de análise a um píxel: tabela .....	37
<b>Figura 4.5</b> – Exemplo de um histograma .....	38
<b>Figura 4.6</b> – Exemplo de um <i>heatmap</i> .....	39
<b>Figura 4.7</b> – Frame do cílio que originou o <i>heatmap</i> .....	39
<b>Figura 4.8</b> – Quimógrafo do cílio com movimento anormal.....	40
<b>Figura 4.9</b> – Gráficos das fases ao longo do tempo. ....	40
<b>Figura 4.10</b> – Diferença de fase para o cílio 1 e cílio 2. ....	41
<b>Figura 4.11</b> – Ponto com dois píxeis devido a artefacto e respectivo erro na janela de <i>log</i> . ....	42
<b>Figura 4.12.A</b> – Cílio com a variação dos ângulos com a horizontal .....	43
<b>Figura 4.12.B</b> – Cílio com a variação entre os ângulos formados pelos conjuntos base-meio e meio-ponta .....	43
<b>Figura 4.13</b> – Exemplo da variação dos ângulos com a horizontal para um cílio normal ao longo do tempo (em <i>frames</i> ) .....	44
<b>Figura 4.14</b> – Exemplo da variação entre ângulos para um cílio normal ao longo do tempo (em <i>frames</i> ) .....	44
<b>Figura 4.15</b> – Exemplo de uma média calculada para uma variação angular com a horizontal em função do tempo em <i>frames</i> .....	45
<b>Figura 4.16</b> – Modelo utilizado para parametrizar a média .....	45
<b>Figura 4.17</b> – Representação de $\Delta t_1$ e $\Delta t_2$ em parte de um gráfico (Figura 4.3) da variação dos ângulos com a horizontal.....	46
<b>Figura 5.1</b> – Variação angular com a horizontal para um cílio normal.....	52
<b>Figura 5.2</b> – Variação angular com a horizontal para um cílio com subexpressão da proteína <i>pkd2</i> .....	53
<b>Figura 5.3</b> – Variação angular com a horizontal para um cílio com sobreexpressão da proteína <i>Arl13b</i> .....	54



<b>Figura 5.4 – Variação angular com a horizontal para um cílio com mutação no gene deltaD...</b>	<b>56</b>
---	-----------



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> - Resumo dos efeitos das mutações de alguns genes envolvidos na PCD .....	6
<b>Tabela 5.1</b> - Listagem da Amostra utilizada. ....	49
<b>Tabela 5.2</b> - Tipos de cílios comparados com ANOVA factor único. ....	50
<b>Tabela 5.3</b> - Média da frequência obtida para cada tipo de cílio .....	50
<b>Tabela 5.4</b> - Análise ANOVA ( $\alpha=0.05$ ) às frequências ciliares. ....	51
<b>Tabela 5.5</b> - Tabela de valores médios para os cílios normais.....	52
<b>Tabela 5.6</b> - Tabela de valores médios para os cílios com subexpressão de Pkd2. ....	53
<b>Tabela 5.7</b> - Resultados ANOVA ( $\alpha=0.05$ ) dos valores $\Delta t1$ e $\Delta t2$ para os grupos Normais/Pkd2. ....	54
<b>Tabela 5.8</b> - Valores médios para cílios com sobreexpressão de Arl13b.....	55
<b>Tabela 5.9</b> - Teste ANOVA para a amplitude de cílios normais/Arl13b.....	55
<b>Tabela 5.10</b> - Valores médios para cílios com mutação DeltaD.....	56
<b>Tabela 5.11</b> - Valores de diferença de amplitude média para cílios normais e cílios com mutação no gene deltaD.....	57



## ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ATP</i>	<i>Adenosina Trifosfato</i>
<i>CEDOC</i>	<i>Centro de Estudos de Doenças Crônicas</i>
<i>FFT</i>	<i>Fast Fourier Transform</i>
<i>IDA</i>	<i>Inner dynein arm</i>
<i>IGC</i>	<i>Instituto Gulbenkian de Ciência</i>
<i>KS</i>	<i>Kartagener Syndrome</i>
<i>ODA</i>	<i>Outer dynein arm</i>
<i>PCD</i>	<i>Primary Ciliary Dyskinesia</i>



# 1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

A discinesia ciliar primária é uma doença maioritariamente autossómica recessiva que resulta em vários quadros clínicos como infecções respiratórias, das quais se destacam a inflamação crónica e a bronquiectasia, <sup>[1]</sup> <sup>[2]</sup> a hidrocefalia, e por vezes associação à doença renal e hepática policística e atresia das vias biliares <sup>[2]</sup><sup>[3]</sup>. O Síndrome de Kartagener é caracterizado pela associação de sinusite e bronquiectasias com a patologia congénita *Situs Inversus*. As principais causas são variadas, e passam, em grande parte dos casos, por alterações genéticas a nível dos genes que codificam as dineínas presentes nos cílios.

O objectivo desta tese será a criação de um *software* que permita uma boa caracterização do padrão de movimento ciliar e da sua frequência, tendo como base imagens em vídeo-microscopia de alta velocidade. As imagens analisadas serão de cílios presentes na vesícula de Kupffer de peixe-zebra (*Danio rerio*). Este órgão embrionário é transiente e funciona como o organizador do eixo direita-esquerda nos peixes teleósteos, sendo homólogo em função ao nó embrionário do ser humano, que também é ciliado. O genoma do peixe-zebra tem uma elevada homologia com o genoma humano e a facilidade da sua reprodução em meio laboratorial, bem como a sua transparência, permitem que este seja um bom modelo para estudos genéticos e para visualização ao vivo de processos biológicos. Assim sendo, pretende-se desenvolver *software* e criar um protocolo de teste para o estudo do movimento ciliar dos cílios da vesícula de Kupffer do peixe-zebra.

Esta abordagem deverá ser uma porta para um melhor conhecimento sobre os passos iniciais na localização assimétrica dos órgãos internos. São estes cílios móveis que irão criar o fluxo direccional responsável pela activação dos

primeiros genes assimétricos na placa mesodérmica lateral (PML). Esse processo culmina com a localização do coração do lado esquerdo do eixo mediano do corpo bem como a correcta lateralidade do fígado e do pâncreas.

Tenciona-se que este *software* se baseie em técnicas de programação e de processamento de imagem, nomeadamente a segmentação, de modo a que seja possível a caracterização do batimento. Serão ainda utilizadas outras ferramentas para a análise da frequência como a transformada de Fourier.

Devido à variabilidade na qualidade das imagens, será preciso criar metodologias de melhoramento de imagem, de modo a maximizar-se a informação a extrair das mesmas.



## 2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO E ESTADO DA ARTE

### 2.1 Estrutura ciliar

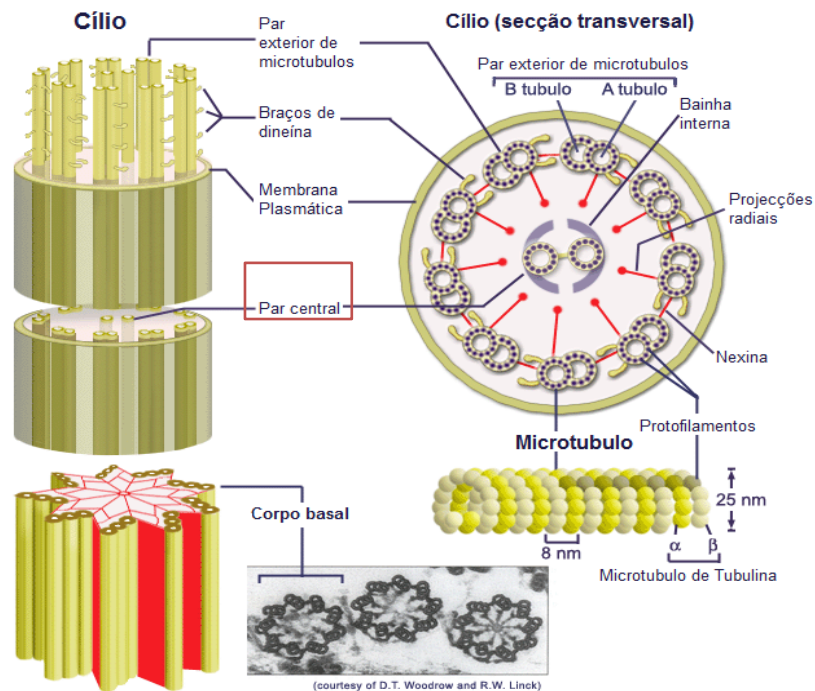
A discinesia ciliar primária afecta o batimento ciliar, sendo que a sua compreensão passa pelo entendimento da estrutura dos mesmos.

Os cílios (ver figura 2.1) são organelos presentes na superfície da maioria das células e são utilizados quer para funções sensoriais quer para impulsionar fluidos ao longo da membrana celular no caso de serem móveis. No corpo humano os cílios móveis possuem diversas funções importantes como a limpeza das vias respiratórias, o movimento do líquido cefalorraquidiano no cérebro, funções sensoriais no nariz e a regulação da localização dos órgãos internos no corpo humano.

Os cílios são compostos por uma base denominada de corpo basal e por um citoesqueleto de microtúbulos denominado axonema. Por fim, são cobertos por membrana ciliar. O principal componente, os microtúbulos, são constituídos por arranjos de moléculas de tubulina  $\alpha$  e  $\beta$  servindo de suporte a todo o cílio.

O corpo basal serve de estrutura nucleadora e base de todo o cílio e é constituído por tripletos de microtúbulos. O axonema (figura 2.1) possui um anel de nove pares de microtúbulos em redor de uma estrutura de dois microtúbulos individuais chamada par central. Cada par de microtúbulos possui dois braços de dineína e uma projecção radial em direcção ao par central. Dependendo do tipo de cílios móveis, este par central pode ou não estar presente. Nos cílios

primários que são não móveis nunca está presente o par central nem os braços de dineínas.



**Figura 2.1** - Estrutura de um cílio móvel. Podemos observar na figura a composição do axonema, com o arranjo dos nove anéis de microtúbulos e do par central. O microtúbulo é constituído por um arranjo de moléculas de tubulina,  $\alpha$  e  $\beta$ , projecções radiais com direcção ao par central e dois braços de dineína. (Adaptado de *ScienceBlogs.com, What's inside a Microtubule?*, acedida a 14 de Janeiro de 2013)

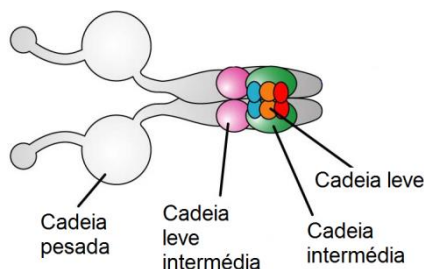
A presença do par central torna-se bastante relevante pois influencia o batimento ciliar. Cílios que exibam par central são denominados 9+2, sendo que os outros se denominam 9+0.

Os cílios 9+2, presentes em células multi-ciliadas, são dotados de motilidade e contêm os dois braços de dineína. Estes braços são os motores moleculares responsáveis pelo movimento ciliar, sendo chamados ODA e IDA dependendo da sua localização. Caso o braço de dineína se encontre virado para o par central (figura 2.1) denomina-se IDA, caso contrário trata-se de um ODA. Por sua vez, os cílios 9+0, chamados de cílios primários, estão presentes em quase todas células do nosso corpo que são células mono-ciliadas e não possuem motilidade. Há um caso excepcional de cílio de conformação 9+0 móvel observado apenas no nó de ratinho e que é utilizado para gerar fluxos nodais. Sendo as-

sim, estes cílios são chamados cílios nodais e localizam-se no nó primitivo aquando a gastrulação do embrião.

Nos peixes-zebra, os cílios nodais encontram-se dentro da vesícula de Kupffer e estão presentes em todas as células. Estão dispostos apicalmente, um por célula e estão orientados para o lúmen que é cheio de líquido. O seu batimento é específico, com rotação no sentido dos ponteiros do relógio. Alterações nestes cílios no ratinho, *Xenopus* e peixe-zebra são conhecidas por influenciarem a assimetria esquerda-direita.

A dineína (figura 2.2) é uma proteína motora que converte ATP em energia que, neste contexto, é utilizada em processos que controlam o movimento ciliar. Pode estar presente tanto nos microtúbulos dos axonema, como no citoplasma. A dineína presente no axonema é constituída por quatro cadeias: a cadeia pesada (DNAH), a leve intermédia (DNALI), a intermédia (DNAI) e a leve (DNAL). Podem conter entre uma a três cadeias pesadas e cada uma destas possui um motor molecular que se associa aos microtúbulos.



**Figura 2.2** – Estrutura da dineína simplificada. (Adaptado de Carter Laboratory – *Structural studies of dynein*. Acedido dia 18 de Janeiro de 2013.)

Uma má codificação dos genes da dineína leva ao seu mau funcionamento e, conseqüentemente a um movimento irregular por parte dos cílios. Os cílios presentes, por exemplo, no tracto respiratório são cílios do tipo 9+2, pelo que a dineína tem um papel importante no seu movimento.

Os cílios possuem um batimento caracterizado pela sua frequência e pela dinâmica do seu movimento. A PCD pode afectar tanto um como o outro, sendo que poderão existir cílios com a frequência de batimento correcta e movimentos atópicos, ou com movimentos correctos e frequências atópicas. Os cílios podem ficar ainda completamente imóveis, ou com ligeiros movimentos espasmódicos.

O padrão de batimento do cílio nodal do peixe-zebra é formado por um movimento composto. O cílio parece descrever um cone, em que dependendo da posição do observador, aparenta dois tipos de movimento. Lateralmente, pode ser observado um movimento ondulatório, semelhante ao movimento de um chicote, e verticalmente observa-se um padrão circular/elipsóide. Este batimento é regulado por mecanismos presentes dentro do axonema, como será descrito na secção seguinte deste capítulo.

Foram identificados vários genes cujas mutações estão na origem da PCD e Síndrome de Kartagener. Nestes casos, são frequentes as mutações nas dineínas que por consequência afectam todo o sistema que controla a motilidade ciliar. Na tabela 2.1 encontra-se um resumo de algumas das mutações conhecidas que podem afectar a motilidade e quais as estruturas ciliares que afectam:

**Tabela 2.1** – Resumo dos efeitos das mutações de alguns genes envolvidos na PCD.

<b>Mutações</b>	<b>Estrutura Afectada</b>	<b>Efeitos</b>
DNAH5	ODA	Ausência de ODAs nos cílios respiratórios resultando em cílios imóveis ou com movimentos residuais.
DNAI1	ODA	Cílios respiratórios com batimentos de frequência reduzida e/ou imóveis
DNAI2	ODA	Cílios respiratórios imóveis ou com movimentos residuais.
DNAH11	Estruturas ciliares normais	Padrão de batimento ciliar irregular e hiperactivo, sem alterações na estrutura dos cílios.
TXNDC3	ODA	Ausência ou encurtamento de ODAs nos cílios. Frequência ciliar normal.
KTU	ODA e IDA	Imobilidade dos cílios.
RSPH4A e RSPH9	Projeções radiais e par central	Ausência destes componentes radiais e cílios com movimentos circulares semelhantes aos dos cílios nodais.

Existem outras alterações que podem afectar o correcto funcionamento dos cílios. Para este trabalho foram estudados cílios com alterações genéticas nas proteínas Pkd2, DeltaD e Arl13b devido à disponibilidade das mesmas por parte do CEDOC@IGC.

A proteína Pkd2 codifica canais de cálcio que influenciam as respostas mecanossensoriais do cílio. Alterações nesta proteína resultam no aparecimento

de rins poliquísticos e em alguns casos podem originar assimetria nos órgãos internos [4]. Neste trabalho foi feita uma sub-expressão da Pkd2 de modo a analisar o batimento ciliar quando o cílio não possui a maioria dos canais sensoriais activos e, por consequência, é incapaz de “sentir” o fluxo presente na vesícula de Kupffer.

A proteína DeltaD está envolvida na via de sinalização *Notch*, com papéis importantes na neurogénese e somitogénese.[5] Os cílios na ausência desta proteína têm um tamanho inferior ao normal e produzem um fluxo mais lento não funcional. [6]

A proteína Arl13b está presente na membrana ciliar e quando sobre-expressa gera cílios muito longos. Alterações nesta proteína podem resultar no Síndrome de *Joubert*. Os cílios com modificações na proteína Arl13b estudados possuem uma sobre-expressão da proteína.

## 2.2 Regulação do batimento ciliar

O movimento ciliar é realizado através do deslizamento dos microtúbulos devido à acção da dineína presente no axonema. Quando os braços de dineína são activados através de ATP provocam um deslizamento dos microtúbulos uns sobre os outros. A regulação da dineína, e consequentemente os batimentos ciliares, é feita através de variações na concentração de cálcio. No entanto, a maneira de como é regulado o cálcio para modular este processo está ainda a ser estudada [7]. Pensa-se que passa por uma via de transdução de sinal que envolve componentes do axonema. A proteína calmodulina (CAM, *calcium-modulated protein*) é um sensor de cálcio presente no axonema dos cílios com motilidade e, em conjunto com outras proteínas auxiliares, as projecções radiais e o par central constituem esta via de transdução.

Um estudo realizado pelo Departamento de Ciências Biológicas na Faculdade de *Darhmouth* [8] verificou a interacção de quatro polipeptídeos com a CAM em condições de alta concentração de cálcio e identificou um complexo proteico, a partir de algas verdes *C. reinhardtii*, cuja proteína FAP221 (análoga à Pcdp1 nos mamíferos) foi identificada como essencial para o controlo da motilidade ciliar. A sua reduzida expressão levou a falhas no arranjo do par central

e deu origem a uma redução da frequência do batimento ciliar e a alterações no seu movimento. As restantes proteínas desse complexo foram também identificadas. A calmodulina actua em vários complexos proteicos dispostos em várias localizações do axonema, desde a base das projecções radiais até ao par central. Sendo assim, alterações na calmodulina, em qualquer um destes complexos, desregulam todo o mecanismo de batimento ciliar.

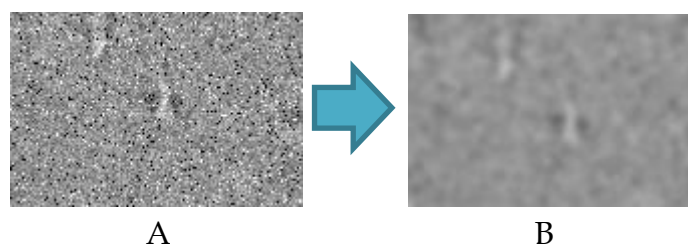
## 2.3 Introdução ao processamento de imagem

Neste trabalho foram utilizados diversos métodos de tratamento de imagem. Uma imagem é a representação visual de um dado objecto. Os métodos de processamento de imagem destinam-se a extrair desta a maior informação possível. Devido ao elevado nível de ruído da imagem será necessário um primeiro tratamento à imagem. O objectivo da fase do pré-processamento é preparar a imagem de modo a que seja mais fácil a extracção de informação.

- **Filtros de redução de ruído**

Existem vários métodos aos quais se pode recorrer, nomeadamente através de filtros de extracção do valor da média, ou da mediana. Os filtros média embora diminuam o contraste da imagem e nitidez das bordas que delimitam os objectos, são extremamente úteis na diminuição de ruído.

Os filtros gaussianos (figura 2.3) permitem reduzir o ruído da imagem, retirando também detalhe à imagem.

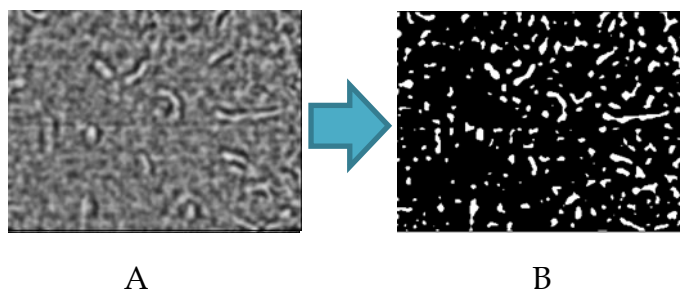


**Figura 2.3** - Aplicação de um filtro gaussiano ( $\sigma=2$ ) à imagem original A. A imagem B apresenta o resultado final.

- **Segmentação**

A segmentação de objectos serve para identificar uma estrutura numa imagem ou sequência de imagens segundo um determinado critério seleccionado pelo utilizador. É importante referir que não existe um método único para a segmentação, sendo que o algoritmo a utilizar depende da imagem e da sua qualidade.

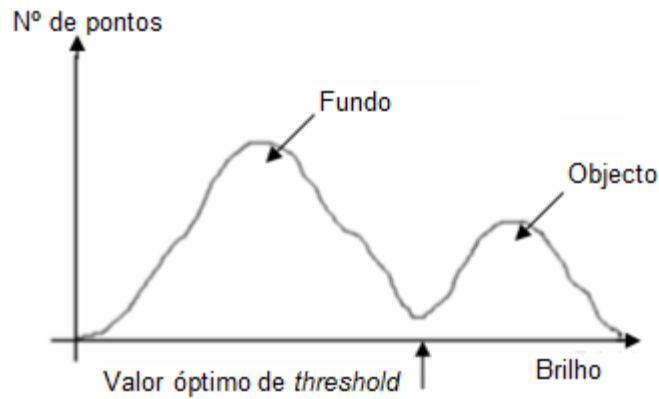
A segmentação pode ser realizada de várias formas e tem como base as intensidades dos píxeis, respondendo a critérios previamente estabelecidos. (figura 2.4). Também se pode efectuar a segmentação manual dos objectos, em que o utilizador define onde é que estes se encontram.



**Figura 2.4** – Exemplo da segmentação utilizando a binarização *Otsu* de objectos. A imagem final **B** obtém-se através de uma binarização da imagem **A** com valor de *threshold* 149.

Um dos métodos de binarização mais simples é a binarização *Otsu*. Este método assume que existem dois grupos distintos de píxeis da imagem, de acordo com a sua intensidade. Tem como base métodos de *thresholding* que tenta minimizar a variância dentro destes grupos, ajustando o valor de *threshold*. Este valor é obtido tendo em conta o histograma de intensidades da imagem (figura 2.5). Por fim, classifica um grupo como cor preta e outro como cor branca, obtendo assim uma imagem binarizada.

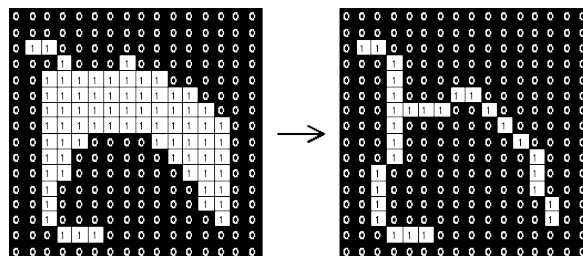
Poderá realizar-se ainda uma binarização em que o valor do *threshold* é escolhido pelo utilizador.



**Figura 2.5** – Histograma de uma imagem. Pode-se observar o valor de *threshold* óptimo para a classificação dos grupos e posterior binarização. Adaptado de [dandiggins.co.uk/arlib-3.html](http://dandiggins.co.uk/arlib-3.html). Acedido a 21 de Setembro de 2014.

- **Esqueletização**

A esqueletização é um processo que permite a transformação da imagem em análise numa forma mais simples, o seu “esqueleto”, como se pode verificar na figura 2.6. Este processo pode, no entanto, levar a perdas de informação.



**Figura 2.6** – Exemplo de esqueletização. Fonte: [homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/HIPR2/thin.htm](http://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/HIPR2/thin.htm). Acedida a dia 21 de Janeiro de 2013.



## 2.4 Transformada de Fourier

Para a determinação das frequências ciliares, utilizou-se a transformada de Fourier. Esta permite a transformação de um sinal no domínio do tempo para o domínio da frequência. Como tal, permite-nos calcular as frequências que compõem o sinal e, desta forma, determinar a sua frequência fundamental. A sua inversa permite transformar um sinal no domínio da frequência para o domínio do tempo.

Seja um sinal no domínio do tempo  $f(t)$ . A sua transformada de Fourier é dada por:

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{j\omega t} dt \quad (1)$$

Em termos computacionais, a transformada de Fourier possui um algoritmo bem definido. Através da biblioteca *pracma* para código R, podemos ter acesso a diversas ferramentas semelhantes às de *Matlab*® que nos permitem o cálculo eficiente da transformada de Fourier.

Dois dos aspectos a ter em conta na aplicação da transformada de Fourier a um sinal são: a dimensão desse sinal e a sua frequência de amostragem. A dimensão do sinal influencia, entre outros aspectos, a velocidade com que o algoritmo vai ser processado. Para maximizar a velocidade de cálculo, utilizam-se sinais com dimensões iguais a  $2^n$ , em que  $n=1,2,3,\dots,N$ .

Seja um sinal  $f(t)$ , tal que  $t = 1,2,3 \dots N$ ,  $N \in 2^n$ ,  $n = 1,2,3 \dots N$ , e uma frequência de aquisição  $fa$ .

A resolução dos valores de frequência  $\omega$  depende de um valor, o *NFFT*, que varia consoante a dimensão total da amostra inicial. Este valor é a potência de 2 da menor potência de 2 maior que a dimensão da amostra. Isto é, se o tamanho da amostra for 230, temos:

$$N = 230$$

$$\begin{aligned}
n = 1 &\rightarrow 2^1 = 2 \\
&\vdots \\
n = 7 &\rightarrow 2^7 = 128 \\
n = 8 &\rightarrow 2^8 = 256
\end{aligned}$$

Sendo assim, o valor de NFFT = 2<sup>8</sup> = 256, visto que 8 é o índice que dá a menor potência de 2 maior que 230. Ou seja, em termos matemáticos:

$$NFFT = 2^n, \quad \text{tal que } N \leq 2^n, \quad n \in \mathbb{Z} \quad (2)$$

Com este valor, definimos a partir da amostra o valor de  $\omega$  tal que:

$$\omega = \frac{fa}{2} * s \quad (3)$$

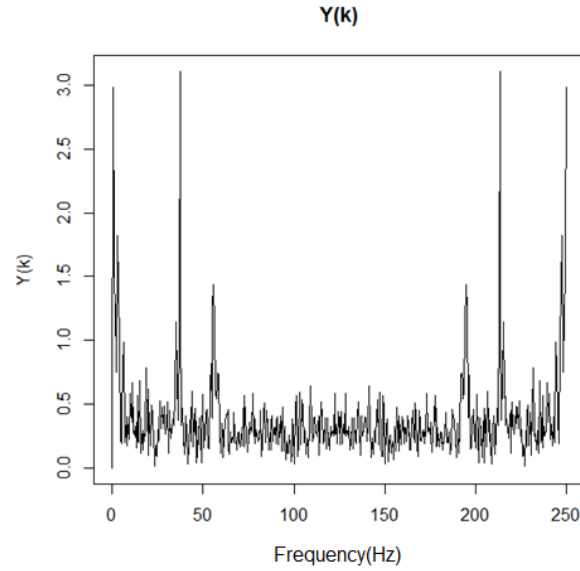
$fa$  - Frequência de aquisição do sinal  $f(t)$

$$s = \left\{1, 2, 3, \dots, \frac{NFFT}{2} + 1\right\}$$

Definindo a variável  $Y(k)$  como

$$Y(k) = \sum_{t=1}^N f(t) e^{\left(\frac{-2\pi j}{N} \times (k-1) \times (t-1)\right)}, \quad k = 1, 2, 3 \dots N \quad (4)$$

A variável  $Y(k)$  dá-nos um espectro duplo de potência, em que o sinal é complexo e espelhado (figura 2.7).

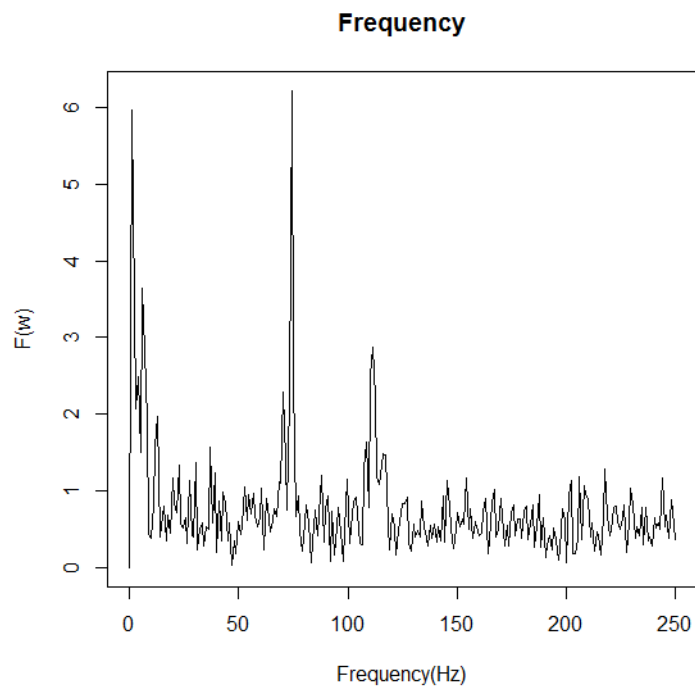


**Figura 2.7** – Representação gráfica de  $Y(k)$  definida na equação 4. Trata-se de um espectro duplo, em que o sinal encontra-se espelhado.

Para obtermos o espectro de potência  $F(\omega)$  sem este efeito calcula-se:

$$F(\omega) = 2 \times |Y(s)| \quad (5)$$

Deste modo obtemos um espectro de frequências simples (figura 2.8) para um sinal  $f(t)$ . Este algoritmo pode ser otimizado de acordo com o sinal, através de filtros aplicados à variável  $Y$  de modo a remover frequências de ruído.



**Figura 2.8** - Exemplo da transformada de Fourier de um sinal  $f(t)$ . Os picos maiores correspondem às frequências mais relevantes do sinal.

## 2.5 Transformada de Hilbert

A transformada de Hilbert ao representar o sinal na sua forma complexa, permite analisar a diferença de fase entre dois sinais ao longo do tempo. Neste trabalho é utilizada para a determinação da diferença de fase entre dois cílios vizinhos. É uma transformada que converte um sinal no domínio do tempo  $f(t)$ , para outro sinal  $\hat{f}(t)$  complexo no domínio do tempo, mas com uma componente imaginária com desfasamento de fase relativamente ao sinal real inicial de  $90^\circ$ .

Para o processamento de sinais, o algoritmo <sup>[9]</sup> para o cálculo da transformada de Hilbert passa pela realização da transformada de Fourier.

Seja um sinal  $f(t)$ , tal que  $t = 1, 2, 3 \dots N$ . Seja  $Y(k)$  a sua transformada de Fourier definida pela equação (4).

Criando um operador  $H(i)$  tal que:

$$H(i) = \begin{cases} 1, & \text{se } i = 1, \left(\frac{N}{2} + 1\right) \\ 2, & \text{se } i = 2, 3, 4, \dots, N/2 \\ 0, & \text{se } i = \left(\frac{N}{2} + 2\right), \dots, N \end{cases} \quad (6)$$

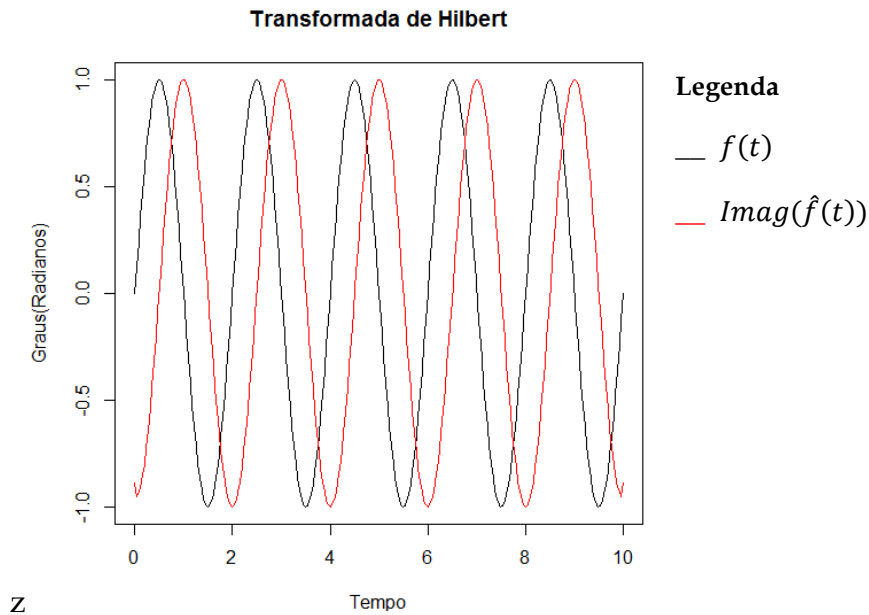
$$Y'(k) = Y(k) .* H(i) \quad (7)$$

Calculando a transformada de Fourier inversa de  $Y'(k)$  obtemos o sinal  $\hat{f}(t)$  que representa a transformada de Hilbert do sinal  $f(t)$ .

$$\hat{f}(t) = FFT^{-1}(Y'(k)) = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N Y'(k) e^{\left(\frac{-2\pi j}{N} \times (1+k) \times (t-1)\right)}, \quad t = 1, 2, 3 \dots N \quad (8)$$

### Exemplo:

Seja um sinal  $f(t) = \sin(\pi t)$ . A sua transformada de Hilbert deverá ser o sinal  $\hat{f}(t)$ , idêntico ao anterior, mas desfasado de  $90^\circ$ . Ao aplicar o algoritmo descrito acima, obtemos o resultado que pode ser observado na figura 2.9.

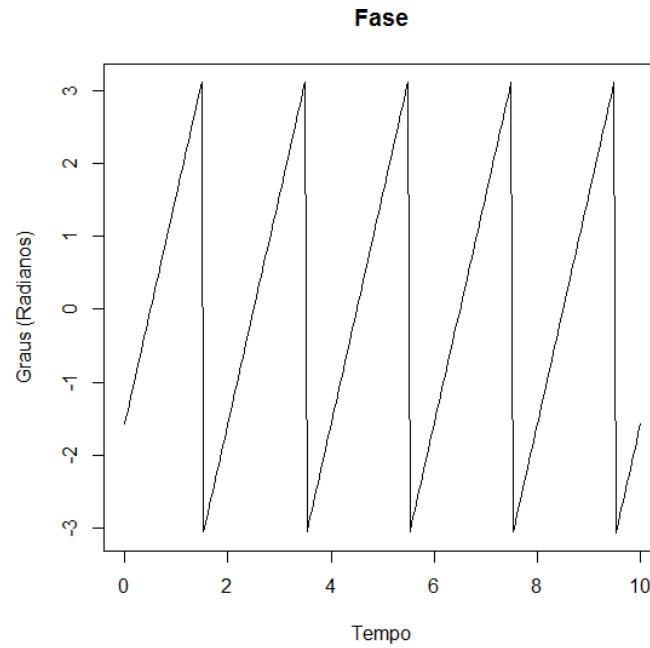


**Figura 1.9** - Transformada de Hilbert do sinal  $f(t) = \sin(\pi t)$ . A vermelho, a componente imaginária da transformada de Hilbert, e a preto, o sinal original.

Esta transformação permite-nos calcular a variação da fase  $p(t)$  de  $f(t)$  ao longo do tempo.

$$p(t) = \tan^{-1} \left( \frac{Real(\hat{f}(t))}{Imag(\hat{f}(t))} \right) \quad (9)$$

Aplicando esta equação ao exemplo anterior obtemos a figura 2.10, que representa a fase ao longo do tempo para a função  $f(t)$ .



**Figura 2.10** – Fase ao longo do tempo de  $f(t)$ .

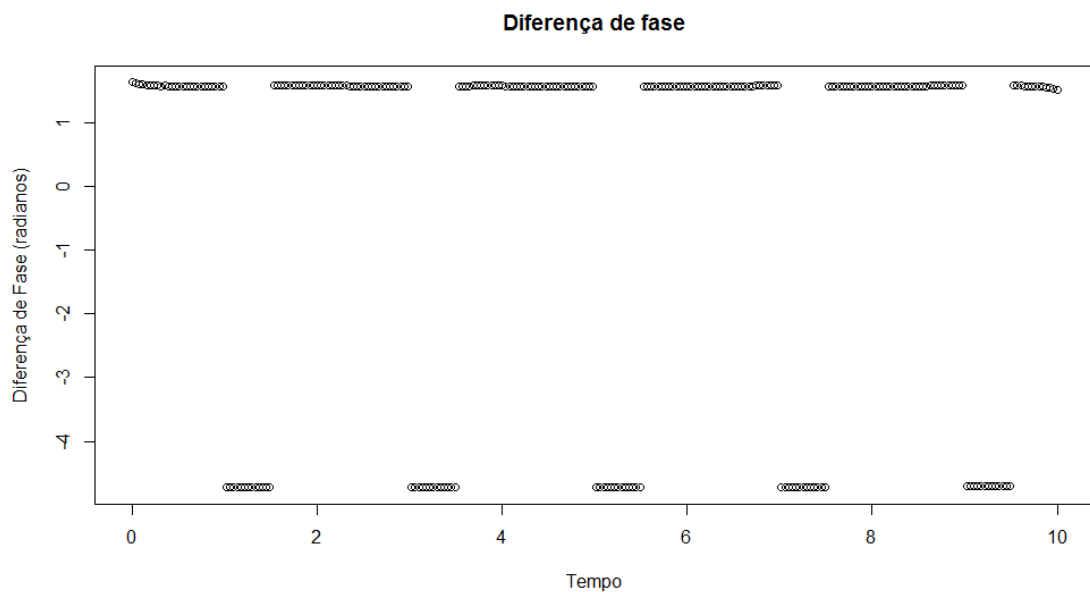
A diferença de fase entre os dois sinais é obtida realizando a transformada de Hilbert para ambos os sinais, calculando para cada um a fase ao longo do tempo e tomando a diferença entre elas.

$$\text{Diferença de fase } (f_1(t), f_2(t)) = \text{Fase de } f_1(t) - \text{Fase } f_2(t) \quad (10)$$

Exemplo:

Seja um sinal  $f_1(t) = \sin(\pi t)$  e  $f_2(t) = \cos(\pi t)$ . Calculando a transformada de Hilbert e a fase ao longo do tempo para cada um, iremos obter, para o seno, as figuras 2.9 e 2.10. Para o co-seno obtemos gráficos semelhantes mas com um desfasamento de  $90^\circ$ .

Calculando a diferença entre a fase de  $f_1(t)$  e  $f_2(t)$  obtemos o gráfico da figura 2.11.



**Figura 2.11** - Diferença de fase ao longo do tempo entre  $f_1(t)$  e  $f_2(t)$ .

Como podemos observar os valores variam entre  $\pi/2$  e  $-3\pi/2$ , o que se encontra correcto tendo em consideração que um seno e um co-seno com a mesma frequência possuem um desfasamento de  $\pi/2$ . (De notar que no círculo trigonométrico,  $-3\pi/2 = \pi/2$ .)



## 2.6 Análise Estatística: ANOVA a um factor

Neste trabalho utiliza-se a análise estatística ANOVA<sup>[10]</sup> a um factor para a validação dos resultados obtidos. Esta ferramenta analisa dois conjuntos de médias e averigua se estas pertencem ou não à mesma população. Por outras palavras, permite classificar as diferenças observadas como relevantes estatisticamente ou não.

Sejam  $\mu_1$  e  $\mu_2$  a média a analisar de populações diferentes, 1 e 2. Assim consideramos as hipóteses:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

Seja a população  $\gamma_i$ , constituída por  $N$  termos. Cada termo desta é dado por:

$$\gamma_{ij} = \mu + \delta_j + \varepsilon_{ij}, \text{ onde } j = 1, 2 \text{ e } i = 1, \dots, N \quad (11)$$

$\mu$  - Média da população total

$\delta_j$  - Desvio da média da população  $j$  perante a média da população total  $\mu$ .

$$\delta_j = \mu_j - \mu \quad (12)$$

$\varepsilon_{ij}$  - Variabilidade dentro de cada população.

De modo a testar se a nossa hipótese  $H_0$  é verdadeira, assume-se que a variância  $\sigma^2$  é igual para as duas populações e que o termo  $\varepsilon_{ij}$  é independente e segue uma distribuição normal, de média 0 e variância  $\sigma^2$ .

Como tal, calculam-se a soma dos quadrados entre populações, a soma dos quadrados dentro da própria população e a soma dos quadrados dentro da população total  $\gamma$ , sendo que  $\gamma = \gamma_1 + \gamma_2$ .

Sabendo que:

$$Soma\ dos\ quadrados(\gamma) = SQ(\gamma) = \sum_{i=1}^N (\gamma_i - média(\gamma))^2 \quad (13)$$

$$SQ(\gamma) = \sum_{i=1}^2 SQ(\gamma_i) + SQ(\gamma_1\gamma_2) \quad (14)$$

Onde

$SQ(\gamma)$  – Soma dos quadrados para a população total  $\gamma$

$SQ(\gamma_j)$  – Soma dos quadrados dentro da população  $\gamma_j$

$SQ(\gamma_1\gamma_2)$  – Soma dos quadrados entre  $\gamma_1$  e  $\gamma_2$

Podemos calcular a soma dos quadrados entre as populações a partir dos outros dois termos.

Podemos assim caracterizar a média dos quadrados,  $MQ$ , para cada um dos grupos dada por:

$$MQ(\gamma_j) = \frac{SQ(\gamma_j)}{\text{graus de liberdade de } \gamma_j} = \frac{SQ(\gamma_j)}{N - J} \quad (15)$$

$$MQ(\gamma_1\gamma_2) = \frac{SQ(\gamma_1\gamma_2)}{\text{graus de liberdade de } \gamma_1\gamma_2} = \frac{SQ(\gamma_1\gamma_2)}{J - 1} \quad (16)$$

$$MQ(\gamma) = \frac{SQ(\gamma)}{\text{graus de liberdade de } \gamma} = \frac{SQ(\gamma_1\gamma_2) + SQ(\gamma_j)}{N - 1} \quad (17)$$

Por fim, calculamos o termo  $F$ , que nos diz a proporção entre a média dos quadrados. Caso  $H_0$  fosse verdadeira, seria de esperar que  $F$  fosse um valor perto de 1 e que as diferenças entre valores na população se deveriam à variação do factor  $\varepsilon_{ij}$ . Sendo assim:

$$F = \frac{MQ(\gamma_1\gamma_2)}{MQ(\gamma_j)} \quad (18)$$

$F$  crítico é o maior  $F$  que pode ser obtido para que a hipótese  $H_0$  seja verdadeira. Este valor encontra-se tabelado, na função de densidade  $F$ . O valor de  $\alpha$ , normalmente 0.05, indica a percentagem de erro que permite calcular este valor. As hipóteses verdadeiras dizem-se verdadeiras com um intervalo de confiança de  $1-\alpha$ , neste caso 0.95 (95%).

## 2.7 Importância da caracterização do batimento ciliar em peixes-zebra

Os peixes-zebra (*Danio rerio*) são uma espécie de peixe tropical de água doce da família das carpas (*Cyprinidae*), originária da região dos Himalaias [11] (figura 2.12). São utilizados como modelo biológico para fins biomédicos devido a diversos factores entre os quais a sua elevada taxa de fertilidade e o facto dos embriões se desenvolverem rapidamente fora da mãe. Os embriões são transparentes, permitindo uma melhor visualização em estudos que careçam de análise de imagens *in vivo*. A utilização destes peixes contribui para uma redução de custos e maior eficiência dos estudos biológicos.

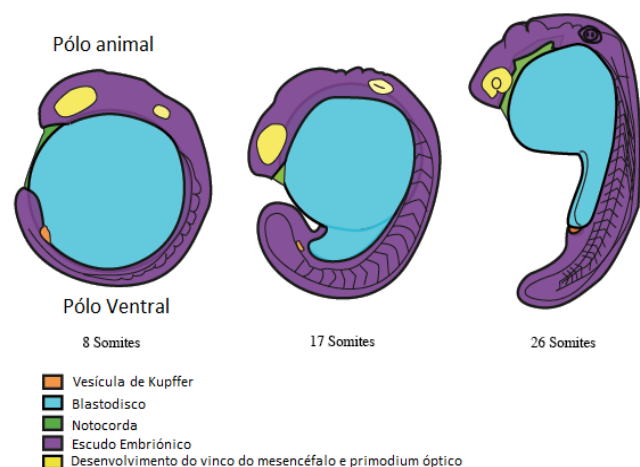
São utilizados como modelo vertebrado para diversos estudos de patologias do foro genético, com a vantagem de que todo o seu genoma está sequenciado e existem muitas estirpes mutantes disponíveis. A capacidade de se poderem efectuar *screening* genéticos rapidamente permite o isolamento de genes específicos para vários processos biológicos. Muitos dos fenótipos mutantes identificados com estes *screenings* são homólogos a mutações que ocorrem em mamíferos e em particular em humanos.

Devido à sua elevada capacidade de regeneração são usados também para estudos a nível de medicina regenerativa e doenças neuro degenerativas. Como modelo para doenças humanas, são também importantes para investigação a nível de ciliopatias, cancro, diabetes e doenças cardiovasculares.



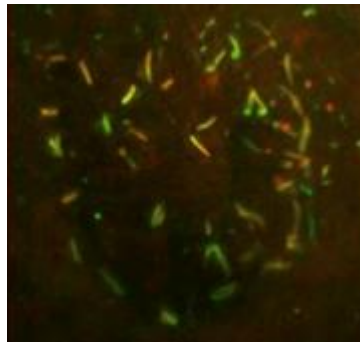
**Figura 2.12** - (acima) Peixe-zebra adulto. Fonte: *thehindu.com* – *Science Scroll* – *Why can't we grow back amputated organs like zebrafish?* Acedida a 15 de Janeiro de 2013.

**Figura 2.13** - (à direita) Estágios do embrião do peixe-zebra e algumas das estruturas observáveis. Fonte: Adaptado de *embryology.med.unsw.edu.au* - *UNSW Embryology* – *Zebrafish* – *Segmentation Period*. Acedida a 15 de Janeiro de 2013.



Os embriões de peixes-zebra utilizados para a obtenção de imagens ciliares para o nosso estudo encontram-se entre os estádios 8 a 10-somitos <sup>[12]</sup> onde é possível a visualização da vesícula de Kupffer na cauda do peixe (ver figura 2.13).

Os cílios observados nesta vesícula são cílios nodais que geram um fluxo nodal (figura 2.14). Durante a gastrulação, o fluxo nodal influencia a localização dos órgãos internos do embrião. Sendo assim, os cílios nodais influenciam a assimetria esquerda-direita no peixe-zebra, e o comprimento destes parece estar igualmente relacionado com a robustez dos fluxos nodais <sup>[13]</sup>. Foram observados vários mutantes de peixe-zebra com problemas de lateralidade, entre os quais uns que apresentavam lateralidade de todos os órgãos, menos do coração, o que é também observado em alguns casos clínicos de PCD (Lopes et. al. 2010).



**Figura 2.14** – Cílios de peixe-zebra na vesícula de Kupffer. Fonte: *cedoc.unl.pt/cilia-regulation-and-disease/*. Acedida a dia 6 de Outubro de 2014.

Os cílios de peixe-zebra permitem o estudo da influência de vários factores genéticos no batimento ciliar, pelo que se consegue recriar em laboratório vários mutantes e posteriormente observar a influência destas mutações.

## 2.8 Estado da arte

Existem diversos métodos de diagnóstico para a discinesia ciliar primária, embora o primeiro passo passe pela identificação dos sintomas mais comuns por parte de um médico, como a dificuldade respiratória, sinusite crónica e outras infecções recorrentes no tracto respiratório e auditivo. Para confirmação de diagnóstico são efectuadas escovagens nasais, medição do nível de NO (óxido nítrico) nasal e testes genéticos através de uma amostra de sangue. [3]

O trabalho de investigação nesta doença é efectuado com base em modelos animais, nomeadamente ratinho, algas *Chlamydomonas reinhardtii* e peixe-zebra, ou em amostra do epitélio nasal de grupos de pacientes já diagnosticados. Os modelos animais possibilitam uma análise mais detalhada dos processos que dão origem à patologia, visto que permitem silenciar genes ou mesmo induzir mutações e, posteriormente, analisar o comportamento ciliar face a estas modificações *in vivo* e num organismo intacto. Os grupos de pacientes permitem estudar evolução da doença a longo prazo.

Actualmente, a contagem da frequência dos cílios e a análise do seu batimento são realizadas maioritariamente de modo subjectivo. Em humanos são efectuadas escovagens nasais com auxílio de zaragatoas, onde são recolhidas amostras de células do epitélio nasal que são enviadas para análise. São gravados vídeos dos cílios de modo a que se possa estudar todo o batimento ciliar. A análise dos batimentos é realizada através da visualização destes a uma velocidade baixa o suficiente para que se possa observar o seu movimento. É ainda analisada toda a estrutura ciliar por microscopia electrónica [2], para averiguar deformações. Existem outros métodos mais antigos de análise da frequência ciliar nomeadamente por espectroscopia, foto díodos e foto multímetros. [14]

Mais recentemente existem programas criados para análise das imagens de vídeo de microscopia para cílios humanos. Entre estes está o ciliaFA [14], que foi desenvolvido por uma equipa da *Action Medical Research* no Reino Unido. Elaborado usando a ferramenta *ImageJ* e com recurso ao Excel, este plugin realiza a análise da frequência do batimento ciliar. No ciliaFA são extraídas intensidades dos píxeis das imagens por vídeo dos cílios e é efectuada uma FFT das intensidades. Se a frequência dos cílios estiver entre 3 a 52 Hz, o programa é ca-

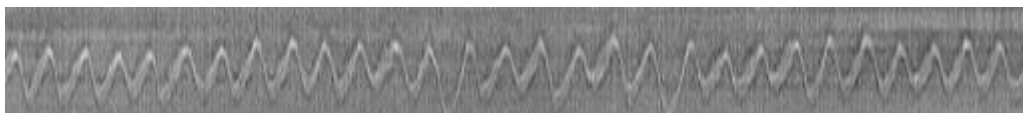
paz de medir o seu valor e apresentar o resultado. No entanto, esta ferramenta trabalha apenas com cílios humanos, estando otimizada para tal.

Para peixes-zebra, os investigadores do grupo “cilia regulation and disease” no CEDOC@IGC criaram uma metodologia para a análise da frequência ciliar. Estabeleceram que a frequência possui valores que variam entre 20 a 40 Hz, com uma média de 33Hz. Determinaram ainda a existência de cílios *wobbling* que possuem, para além da frequência principal, uma frequência secundária de valor inferior. [24] São cílios raros, que apenas constituem cerca de 14% da população. [24]

O padrão de batimento ciliar ao longo do tempo pode ser visualizado através de um quimógrafo, tendo como base os vídeos da vesícula de Kupffer (figura 2.15 e 2.16). Este dá uma projecção da variação dos píxeis, em ordem a x ou a y, ao longo do tempo. O quimógrafo para os cílios *wobbling* revela um padrão irregular (figura 2.16), ao contrário da de um cílio normal (figura 2.15).



**Figura 2.15** – Quimógrafo de um cílio normal.



**Figura 2.16** – Quimógrafo de um cílio *wobbling*.

## 3. PROCESSAMENTO DE IMAGEM

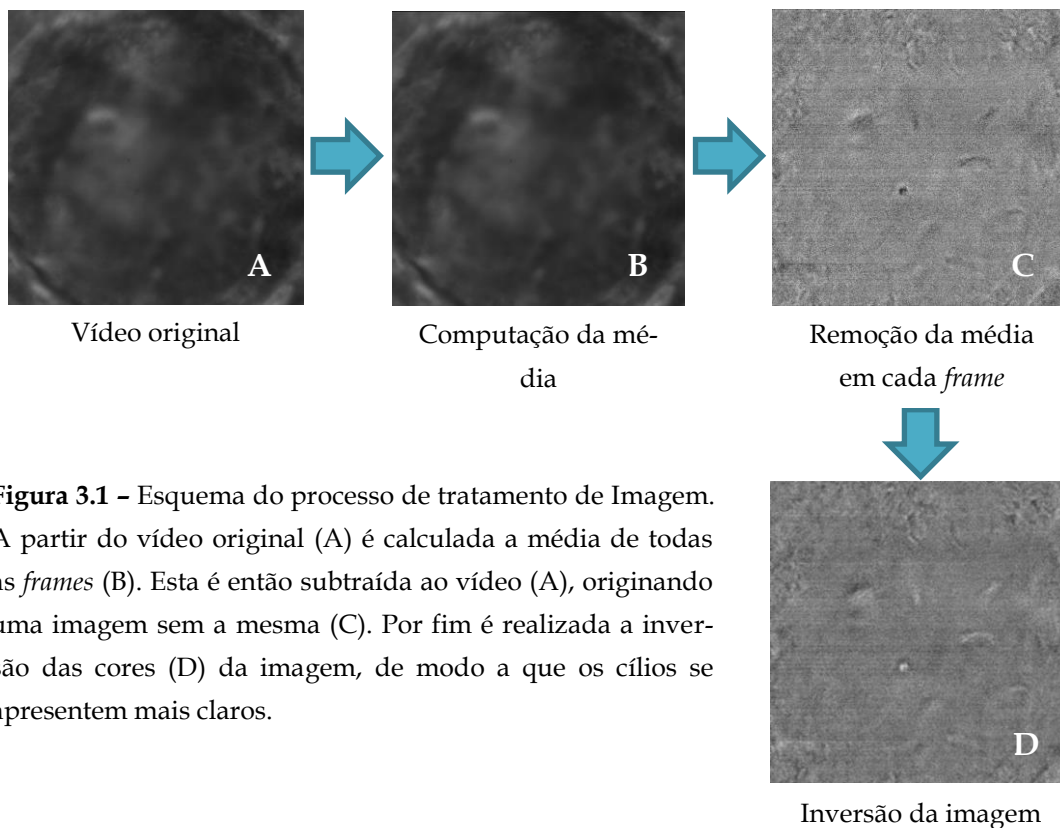
### 3.1 Pré-processamento geral

Os vídeos analisados são recolhidos por microscopia electrónica pelos investigadores do CEDOC@IGC. São filmadas vesículas de Kupffer de peixes-zebra *in vivo*, a partir de embriões aos quais podem, ou não, ter sido induzidas alterações genéticas. Estes encontram-se na fase de desenvolvimento 8 a 10 somitos, na qual ainda não existe formação dos órgãos internos e é possível a visualização da vesícula de Kupffer na cauda do peixe. O processo de formação dos órgãos irá ser influenciado pelo movimento dos cílios nodais presentes na vesícula.

Os filmes são adquiridos a uma taxa de aquisição de 500 *frames* por segundo e desacelerados para 30 *frames* por segundo. Com recurso ao programa de tratamento e análise de imagem *ImageJ* os vídeos serão processados de modo a ser extraído a maior quantidade de informação possível.

Apesar da membrana da vesícula ser transparente, nos vídeos é possível a observação de uma camada (figura 3.1 A) que, impede a visualização dos cílios. Como esta é estática, ao efectuar a projecção da média de cada um dos píxeis da imagem, obtém-se uma imagem da membrana (figura 3.1 B). Com a subtracção da mesma em cada *frame* eliminamo-la obtendo apenas a imagem do interior vesícula (figura 3.1 C). Desenvolveu-se uma sucessão destes comandos – uma *Macro* – de modo a que o tratamento possa ser efectuado em qualquer filme.

Posteriormente foram desenvolvidas mais *macros*, nomeadamente de extracção de ruído, binarização e melhoramento de imagem mas devido à baixa resolução dos vídeos estas não chegaram a ser utilizadas neste trabalho.



**Figura 3.1** – Esquema do processo de tratamento de Imagem. A partir do vídeo original (A) é calculada a média de todas as *frames* (B). Esta é então subtraída ao vídeo (A), originando uma imagem sem a mesma (C). Por fim é realizada a inversão das cores (D) da imagem, de modo a que os cílios se apresentem mais claros.

## 3.2 Processamento de imagem para a caracterização do movimento ciliar

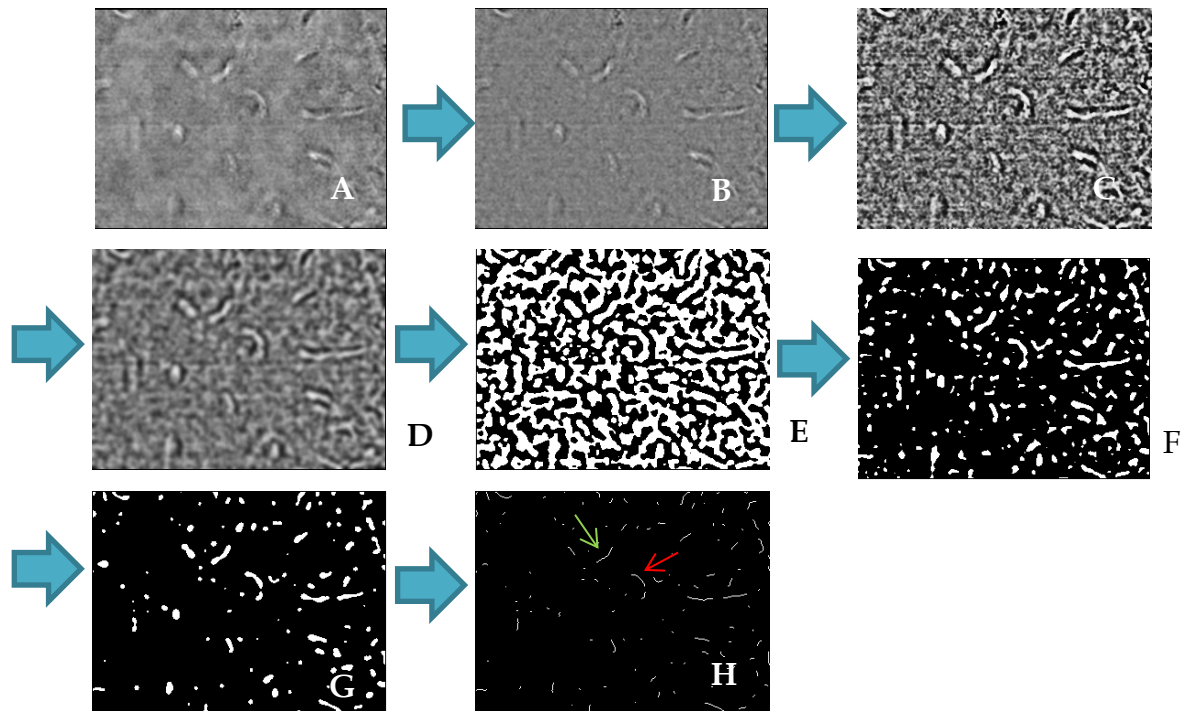
### 3.2.1. Primeiros algoritmos e suas limitações

Numa primeira fase pensou-se em automatizar ao máximo a segmentação dos cílios de modo a adquirir valores de referência para o movimento. Através de *macros* conseguiu-se uma ordem de comandos que, com o ajuste do utilizador, levavam à binarização e posterior esqueletização do cílio.

Os vídeos eram tratados como descrito na figura 3.1. De seguida, eliminava-se ao máximo o ruído de fundo (figura 3.2 B). Como este processo diminuía o contraste da imagem, era pedido ao utilizador que o ajustasse de modo a que o cílio ficasse bem visível (figura 3.2 C). De seguida era aplicado um filtro gaussiano que iria suavizar as bordas, evitando parte do ruído introduzido pelo contraste. (figura 3.2 D) A imagem era então binarizada (figura 3.2 E e F), com ajuste manual, de modo a evitar perdas de informação e seguia-se a remoção dos



*clusters* (figura 3.2 G), num processo cíclico, com a ferramenta *Remove Clusters* presente no *ImageJ*. Tal como nos processos anteriores, o utilizador devia medir a remoção de modo a que não se perdesse parte do cílio. Por fim esqueletizava-se a imagem (figura 3.2 H).

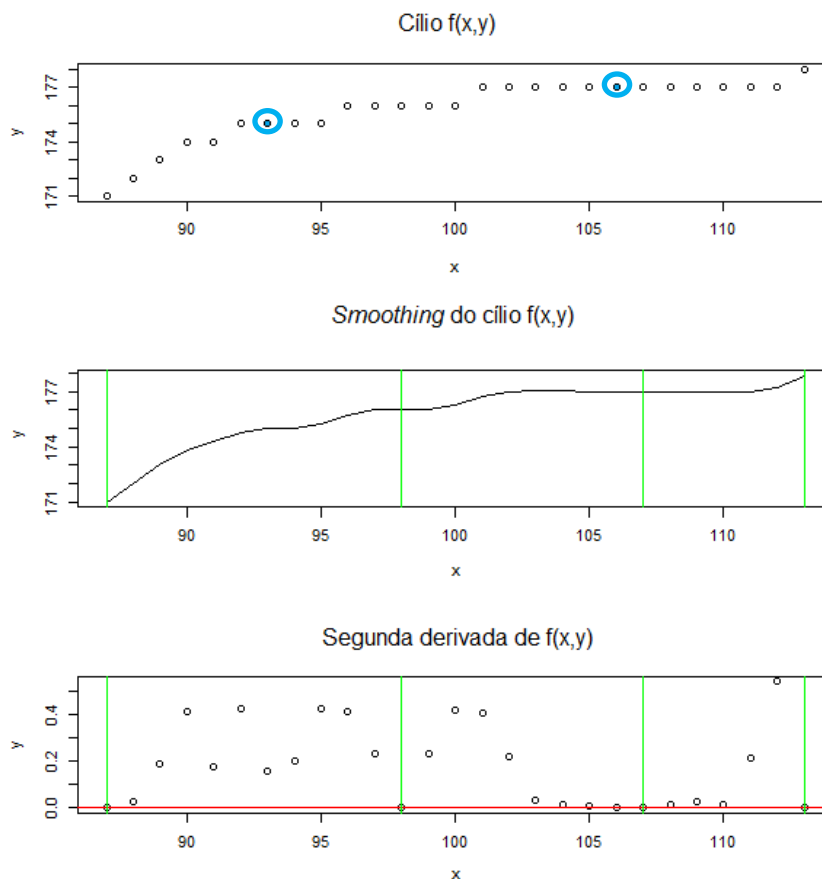


**Figura 3.2** – Primeiro processo de tratamento da imagem, desenvolvido para a caracterização do movimento ciliar. A partir da imagem (A) era retirado o ruído de fundo (B) e aumentado o contraste (C). Devido ao aumento do ruído, aplicava-se um filtro gaussiano (D) que suavizava a imagem. Esta era binarizada (E e F) e removia-se as partículas de fundo que mais proeminentes (G). Por fim era esqueletizada para obter a zona central do cílio (H). Podemos observar assinalado a verde um cílio cujo tratamento não alterou a sua geometria e assinalado a vermelho um cílio que sofreu “um corte” devido à binarização e posterior remoção de *clusters*.

O objectivo passava por guardar os pontos referente à zona central do cílio, obtidos através da esqueletização, e tentar deduzir automaticamente, através de código R, as coordenadas que delimitavam a ponta, o meio e a base.

Cada conjunto de pontos que representava a zona central era considerado como uma função  $f(x,y)$ . (figura 3.3) Os pontos da função eram ordenados e era aplicado um *smoothing* de modo a facilitar o cálculo da segunda derivada. Com esta determinava-se os pontos de inflexão que, teoricamente, iriam correspon-

der aos pontos que iriam segmentar o cílio. Apesar de as *macros* e o código em R para o tratamento e divisão do cílio terem sido desenvolvidos, os resultados obtidos não foram satisfatórios.



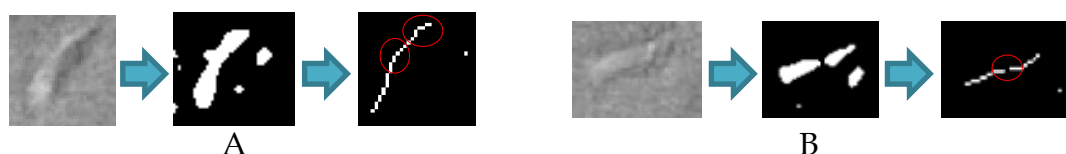
**Figura 3.3** – Exemplo de um cílio  $f(x,y)$ . Segundo este resultado, a segmentação iria ser aplicada nos pontos marcados a verde. Se examinarmos o cílio, os pontos a azul marcados no primeiro gráfico efectuem uma segmentação mais correcta.

Devido à natureza irregular da binarização existiam zonas onde eram detectados dois pontos de inflexão errados, em determinados casos, relativamente próximos dos reais. Na figura 3.3 podemos observar que dois dos pontos determinados (a verde) se encontram bastante perto do pontos que efectuem uma segmentação correcta (a azul).

O movimento ciliar, como já foi descrito, decompõe-se em dois tipos: um lateral, que se caracteriza por um movimento ondulatório semelhante ao de um chicote, e um rotacional, que não é completamente captado pelos vídeos quan-

do o cílio se encontra na posição lateral. Este último causa um ligeiro desvio na ponta dos cílios de perfil, o que origina uma perda de contraste tal que, em determinadas *frames*, a intensidade dos píxeis não permite à binarização seleccionar aqueles píxeis como parte do cílio.

Devido ao ruído da imagem, a binarização também encontrava muitos artefactos (figura 3.4 A) e as próprias bordas do cílio eram inconstantes (figura 3.4 B), alterações na geometria do cílio que não correspondiam à realidade. O movimento ciliar era assim, incompleto, visto que parte do cílio poderia não estar presente e arriscar-se-ia a que fossem induzidas alterações no movimento devido ao ruído.



**Figura 3.4** – Dois exemplos de problemas relacionados com a binarização. **A.** Pode-se observar o artefacto criado na borda do cílio pelo ruído. **B.** O desaparecimento de parte do cílio devido ao contraste da imagem. Ambos originam irregularidades, assinaladas a vermelho.

A dificuldade na selecção dos pontos da base, do meio e da ponta, levou a que se implementasse pontos guia inseridos pelo utilizador, que seriam usados pela função. Apesar disto, a perda de informação durante a fase de binarização continuava a dificultar a previsão dos pontos e resultava em segmentações incorrectas.

Optou-se, assim, por uma selecção manual dos pontos de segmentação do cílio. Seguindo o protocolo desenvolvido (Anexo I) o utilizador deve seleccionar quatro pontos por cada *frame*, dividindo-o em ponta, meio e base do cílio. Este método permite que não se perca informações, já que mesmo com desaparecimento de parte do cílio devido ao seu movimento rotacional é possível perceber o seu movimento através da observação da sequência de imagens.

### 3.2.2.Procedimento actual

Num vídeo com pelo menos 100 *frames*, o utilizador deverá seleccionar um cílio que esteja em posição lateral, com um movimento bem definido. A imagem do cílio deve estar posicionada de modo a que a base do cílio se encontre virada para a esquerda e o mais próximo possível da borda esquerda da imagem, preferencialmente na posição horizontal (figura 3.5).

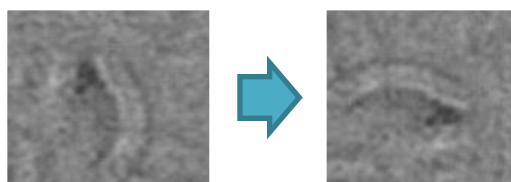


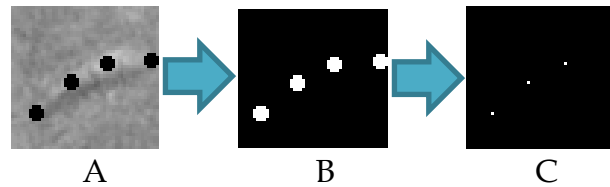
Figura 3.5 – Rotação de um cílio.

Neste processo não deverão ser utilizadas operações de rotação que não sejam de inversão horizontal e vertical ou de  $\pm 90^\circ$ . Outro tipo de rotações podem vir a introduzir alterações na forma da imagem originando erros de interpolação nos píxeis e, como tal, não devem ser utilizadas.

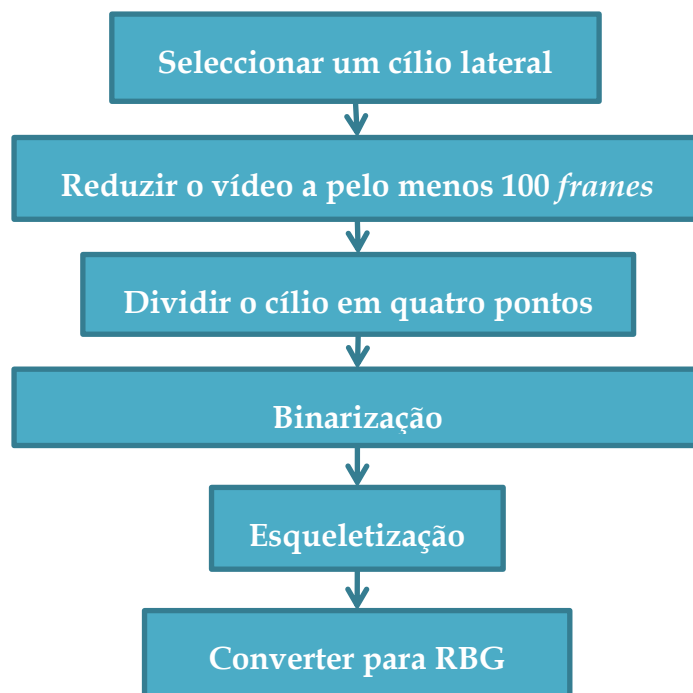
São marcados quatro pontos (figura 3.6 A). A marcação destes deve ter como base os locais onde a estrutura ciliar apresenta inflexões, bem como a distância entre os pontos. O critério utilizado foi o de dividir o cílio em três partes com dimensões semelhantes, com excepção para casos em que o movimento do cílio sugira uma outra segmentação. Para minimizar erros deverão ser marcados primeiro os pontos que se localizam nos limites do cílio (ponta e base) e posteriormente os dois pontos intermédios que irão segmentar o cílio em três partes.

Para destacar os pontos marcados utiliza-se uma binarização. Esta consiste num método de *clustering*, em que assume que parte dos píxeis da imagem constitui um grupo, que deverá ser branco, e outro que será a preto. No nosso caso apenas os pontos deverão estar seleccionados em todas as *frames*. O fundo deverá ser escuro, com os pontos a branco. Sendo assim aplica-se uma binarização com o *threshold* a 0, sendo esta a cor preta. De seguida é realizada uma esquele-

tização que reduz os pontos a um único píxel e estes vão ser a base de trabalho do resto do processo. Na figura 3.7 encontra-se um esquema ilustrativo dos procedimentos usados no processamento.



**Figura 3.6** – Exemplo da aplicação da binarização à imagem com os pontos marcados a preto e posterior esqueletização. **A.** Marcação dos quatro pontos. **B.** Binarização. Como se pode observar o método de binarização permite a marcação de um limite que determina que todos os píxeis que não se encontrem a preto na imagem fiquem a preto, e os restantes a branco. **C.** A esqueletização. Esta reduz estes pontos a apenas um píxel que vai constituir a base de trabalho para a análise do movimento.



**Figura 3.7** – Esquema do pré-processamento para a caracterização do movimento ciliar.



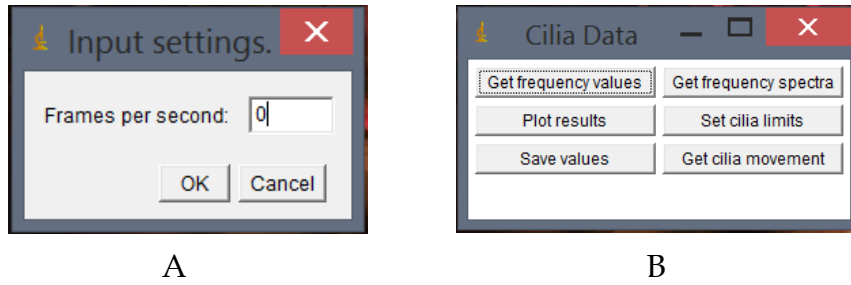
## 4. PROCESSAMENTO DE DADOS

### 4.1 Criação de um *plugin* para *imagej*

O *ImageJ* é uma ferramenta de tratamento de imagem para fins científicos de domínio público desenvolvido pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América. Como o nome indica o seu código tem como base linguagem JAVA e permite a criação e instalação de *plugins* tendo um elevado nível de personalização de acordo com cada utilizador.

O *plugin* criado no decorrer deste trabalho foi desenvolvido em JAVA e tem como objectivo facilitar a recolha de dados dos vídeos e nele estão contidas as ferramentas para a aquisição de dados para o posterior cálculo da frequência e caracterização do movimento. Permite ainda guardar estes dados sob o formato de texto, que irá servir de base para o processamento em R o qual será discutido nas próximas secções.

O *plugin* foi desenhado de modo a que a sua utilização seja fácil e intuitiva para o utilizador. Numa primeira instância, quando se corre o *plugin*, é pedido ao utilizador que insira a taxa de aquisição do vídeo em *frames* por segundo (figura 4.1 A). Se este for um valor válido, inicia a interface do *plugin* (figura 4.1 B). Esta é constituída por seis botões, organizados numa janela e dispostos por tipo de aquisição. A funcionalidade de cada um será descrita nas secções seguintes.



**Figura 4.1** – **A.** Interface inicial para a inserção da taxa de aquisição do vídeo e **B.** Interface do *plugin*.

#### 4.1.1. Limitações do *ImageJ*

Uma das principais limitações do *ImageJ* é a capacidade de memória e a velocidade de processamento, pelo que o algoritmo não pode armazenar valores de um grande número de variáveis. Dado que cada vídeo tem no máximo 512 *frames* seria necessária uma lista de  $x \times y$  matrizes, com 512 valores de intensidade cada uma, o que se provou impossível, visto que o *plugin* para além de demorar tempo excessivo não chegava a guardar os valores alegando falta de memória.

O problema da falta de memória, aliado à morosidade do programa a realizar operações de cálculo complexas, levou a que se utilizasse o R como ferramenta de análise de dados. Sendo assim, os vídeos são processados em *Imagej* e com o *plugin* retiram-se todos os dados necessários para em R efectuar a determinação das frequências ciliares e caracterização do movimento ciliar.

A utilização de linguagem R neste trabalho deve-se ao facto de este já ser utilizado pelos investigadores do CEDOC@ICG, pelo que facilita a compreensão e uso das ferramentas desenvolvidas no decorrer deste trabalho.

## 4.2 Cálculo das Frequências ciliares

O grupo de investigação “cilia regulation and disease” no CEDOC@ICG desenvolveu uma metodologia para a caracterização das frequências, no entanto para este trabalho também se estudou a frequência dos cílios aos quais se fez a análise do movimento. Como tal, incorporou-se no *plugin* um método de recolha de dados para cálculo da frequência, tanto para um píxel, como para to-

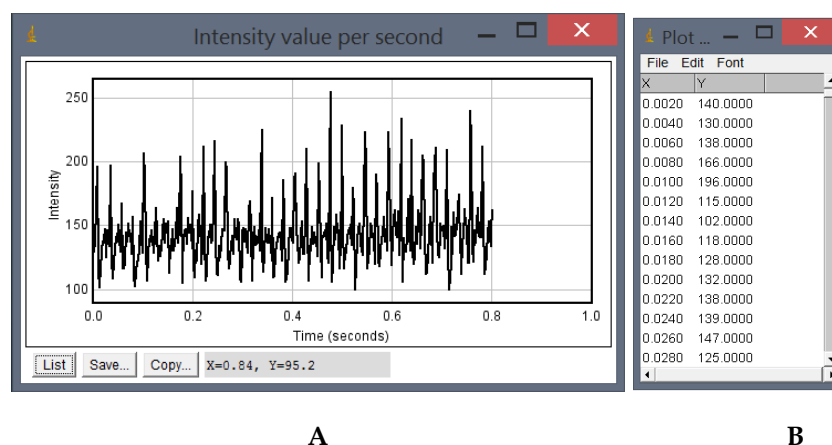


dos os píxeis da imagem. Apesar de se basear na mesma metodologia, o algoritmo desenvolvido pelo grupo de investigação, é executado de maneira diferente, na medida em que adquire a variação de intensidades de um píxel directamente no quimógrafo, exportando os dados para R onde calcula a transformada de Fourier.

O código em R para a determinação das frequências tem como base a transformada de Fourier, quer seja para um píxel, quer seja para vários. Consoante o tipo de processamento escolhido, pode determinar a frequência ciliar, sendo que o cálculo a vários píxeis permite uma determinação da frequência principal mais fiável. No entanto na análise de cílios wobbling, o uso de vários píxeis mascara a frequência secundária, pelo que o cálculo da frequência associada apenas a um píxel nestes casos se torna mais vantajosa.

#### 4.2.1. *Plugin - Aquisição de dados para o cálculo da frequência*

A determinação da frequência ciliar assenta na variação de intensidade de um ou mais píxeis da imagem. Observando a interface do *plugin* observamos diversas funções (figura 4.1 B). A função “*Get frequency values*” adquire a intensidade de um único píxel para cada *frame* do vídeo, armazenando-a. Os valores podem ser visualizados graficamente ao longo do tempo seleccionando a opção “*Plot results*” (4.2 A). Esta opção permite ainda ao utilizador observar os valores adquiridos sob a forma de lista (4.2 B).



**Figura 4.2** – Janelas obtidas ao efectuar a recolha de intensidades para um píxel. **A.** Variação de intensidades obtida para um píxel. **B.** Lista das intensidades obtidas e os seus tempos.

Seleccionando a opção “*save values*” podemos guardar os valores numa localização à escolha, bastando para tal digitar o caminho. O ficheiro terá formato de texto e o nome “*Intensity\_values*” seguido da data e hora de aquisição. Este ficheiro contém um cabeçalho com informação geral do vídeo como a data de aquisição, *frames* por segundo, número de *frames* e coordenadas do píxel onde foi adquirida a variação de intensidade. De seguida, apresenta uma tabela com a *frame*, o tempo e a intensidade (de 0 a 255) do píxel em causa.

Para o utilizador adquirir os dados para o cálculo da frequência para um píxel, aconselha-se a visualização do quimógrafo do cílio em questão para determinar qual o melhor local para fazer a aquisição. O quimógrafo pode-se visualizar no *ImageJ* através das teclas de atalho ctrl+shift+H. O píxel deve ser aquele que corresponde ao pico superior da onda deste para evitar o aparecimento de harmónicas.

A função “*Get frequency spectra*” obtém a intensidade para cada um dos píxeis que constituem a imagem ao longo do tempo. Estes valores são guardados num documento de texto de nome “*TotalIntensityValues*” à medida que são obtidos. Este documento terá no cabeçalho o tamanho x,y da imagem em píxeis, a data de aquisição, as FPS e o número de *frames*. De seguida, apresenta o número de cada píxel, a sua intensidade e a *frame* correspondente. O número do píxel permite a identificação do local do mesmo, possibilitando a criação de um espectrograma com as frequências de cada píxel.

#### 4.2.2. Código R – Cálculo da frequência de um único píxel

Quando o utilizador corre o código R, é-lhe pedido o ficheiro de texto que contém as intensidades ao longo do tempo para o ponto em questão.

Existem no código diversas constantes que deverão ser ajustadas pelo utilizador antes de o correr, nomeadamente o factor de conversão, que vai converter a frequência obtida de acordo com a frequência de aquisição do vídeo, e o pico máximo de potência (*Pks*) que deve ser considerado. Por defeito assume-se que o factor de conversão é 500/30.

$$\text{Factor de conversão} = \text{Frequência de aquisição} / \text{Frequência real do vídeo}$$

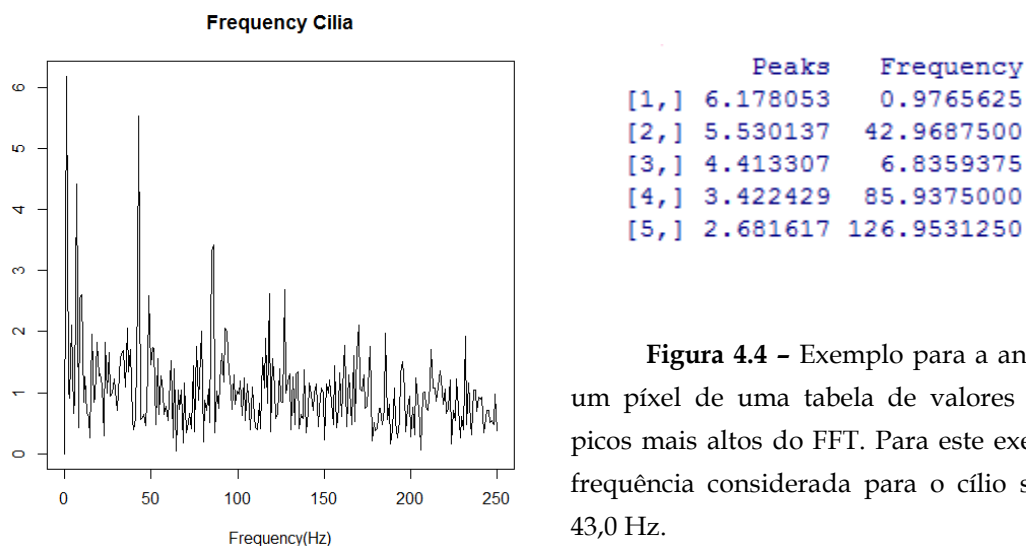
O processo de cálculo da transformada de Fourier tem como base a variação das intensidades ao longo do tempo.

Primeiro é filtrada a média deste sinal e determinado o NFFT de acordo com o número de *frames* do vídeo. O sinal é então cortado ou preenchido com zeros, dependendo do valor de NFFT.

Com este novo sinal é calculada a transformada de Fourier. O sinal obtido é filtrado em relação à potência  $F(\omega)$  de acordo com a constante  $Pks$ , visto que o ruído de fundo pode atingir valores de potência muito elevados mascarando a frequência ciliar.

De seguida são determinados os picos mais altos da transformada. Este processo só considera picos com frequências superiores a 6 Hz, visto que a gama das principais frequências de ruído se encontra entre os 0 e 6 Hz. O pico máximo corresponde à frequência do cílio ou, por vezes, à sua harmónica mais próxima. Na figura 4.3 pode ser observado um espectro de frequência para um cílio. Para frequências inferiores à gama de ruído, o pico mais alto corresponde à frequência 43,0 Hz, sendo esta a sua frequência fundamental. De seguida observam-se algumas harmónicas com picos igualmente elevados.

Os primeiros cinco picos mais altos são apresentados na janela em R para consulta do utilizador (figura 4.4), sendo assinalado o pico máximo.

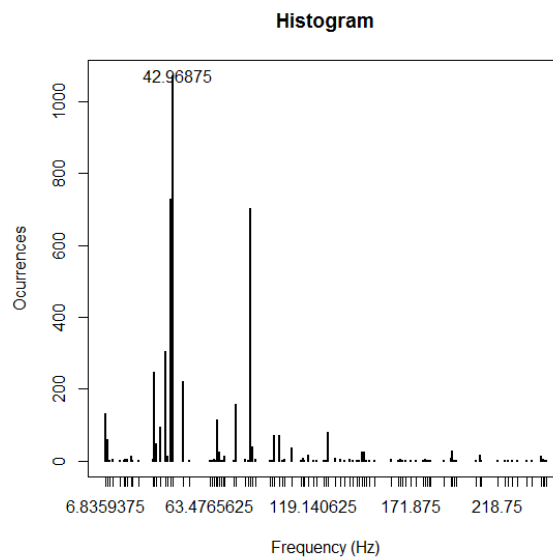


**Figura 4.3** – Exemplo para a análise de um píxel do espectro obtido após a aplicação do algoritmo FFT.

**Figura 4.4** – Exemplo para a análise de um píxel de uma tabela de valores com os picos mais altos do FFT. Para este exemplo a frequência considerada para o cílio seria de 43,0 Hz.

### 4.2.3. Código R - Cálculo da frequência para vários píxeis

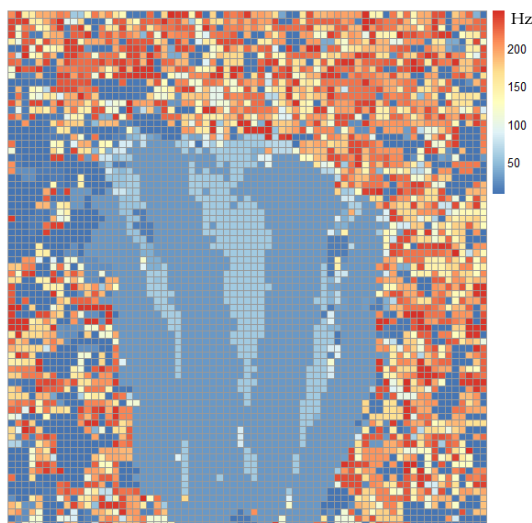
Quando se trata de vários píxeis, este processo repete-se para cada um dos píxeis que representam a imagem. Cria-se uma matriz com a dimensão da imagem e nesta são guardados os valores do pico máximo de acordo com as coordenadas (x,y) do píxel que está a ser analisado. É ainda calculada a frequência média do conjunto dos píxeis. Ao utilizador é apresentada a tabela das frequências presentes e a sua contagem, bem como o histograma (figura 4.5) das mesmas.



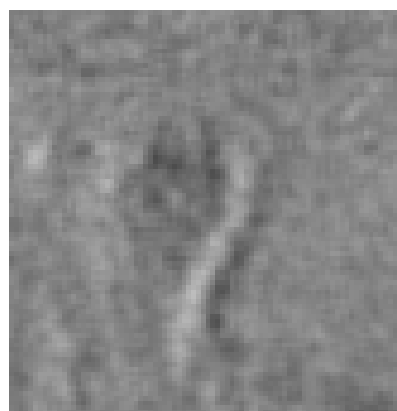
**Figura 4.5** - Exemplo de um histograma para o mesmo cílio que a imagem anterior mas utilizando a totalidade dos píxeis. Como se pode observar o resultado é o mesmo, 42.97Hz.

A observação da frequência de cada um dos píxeis da imagem traz vantagens, nomeadamente permite o cálculo de frequências mesmo que estas estejam bastante mascaradas pelo ruído sendo um método de cálculo mais fiável que o de apenas um píxel.

O utilizador pode ainda realizar o *heatmap* das frequências (figura 4.6) para esta imagem, observando todas as frequências da imagem e a sua localização na mesma. Correspondendo esta abordagem a uma extensão dos procedimentos já realizados no CEDOC@ICG.



**Figura 4.6** – *Heatmap* de um cílio. A escala encontra-se em Hz. Pode-se observar uma enorme prevalência de frequências na gama a que corresponde a frequência do cílio (figura 4.7). No fundo sobressaem as frequências mais altas visto que se filtrou parte das mais baixas aquando da realização do FFT.



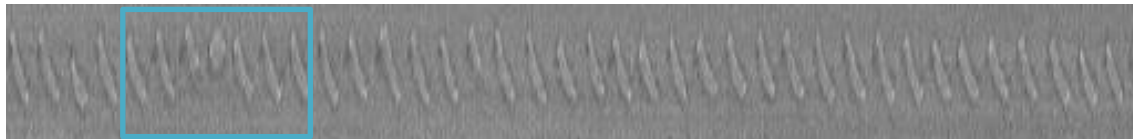
**Figura 4.7** – Frame do cílio que originou o *heatmap*. O seu movimento pode ser observado no *heatmap* pelas zonas que correspondem à frequência ciliar (azul).

#### 4.2.4. Código R - Estudo da diferença de fase entre cílios

Utilizando os ficheiros das intensidades associado apenas a um píxel aplicou-se a transformada de Hilbert com o objectivo de analisar a diferença de fase entre dois cílios. Esta, tal como já foi discutido, permite analisar a diferença de fase entre dois sinais através da representação complexa de cada um deles longo do tempo.

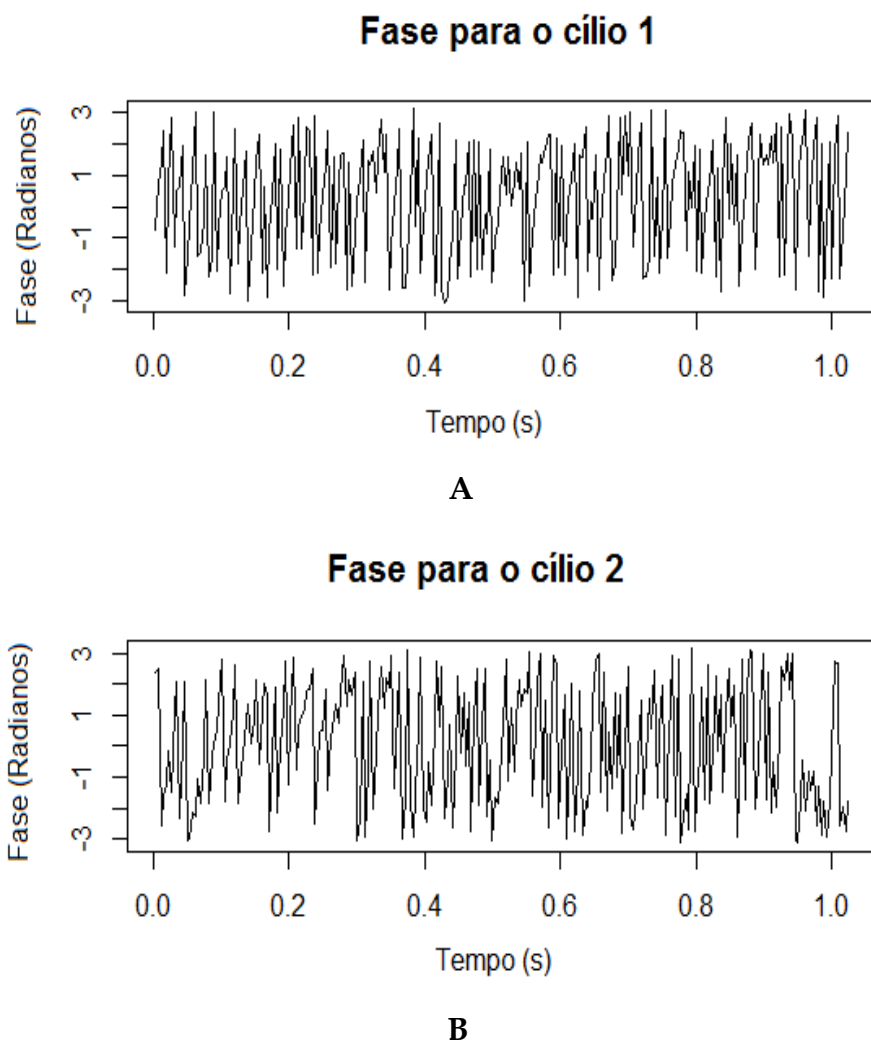
Esta análise derivou da observação de certas irregularidades no movimento ciliar que aparentavam ser semelhantes a um acerto de fase entre vários cílios (figura 4.8). Apesar de este facto só ter sido observado num conjunto de cílios (normais) tentou estudar-se a possível relação entre as suas diferenças de fase durante um intervalo definido de frequência ciliar.

O cílio em questão era um cílio que se observava num plano vertical, e que aquando a rotação realizava “uma breve paragem”. O quimógrafo encontra-se representado na figura 4.8.

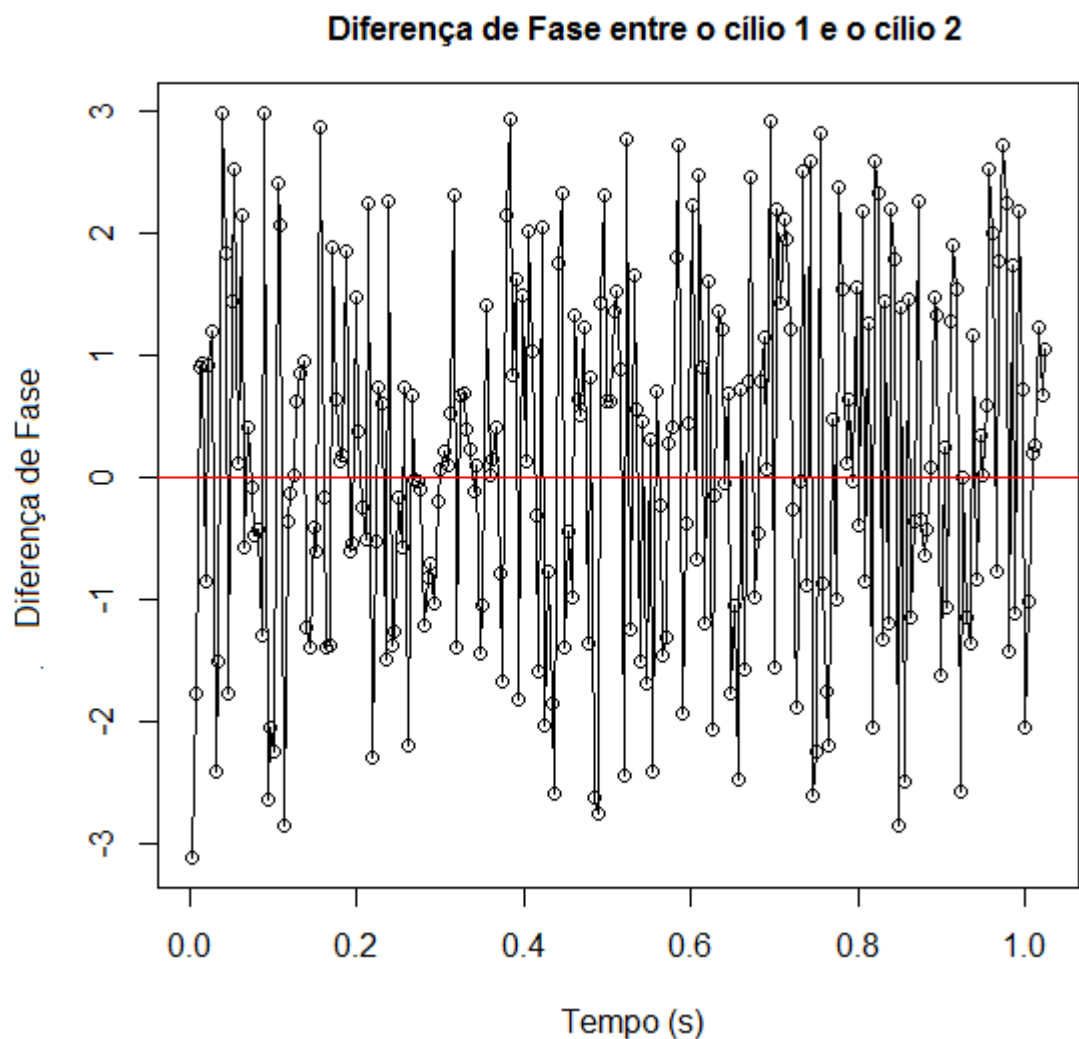


**Figura 4.8** - Quimógrafo do cílio com movimento anormal assinalado a azul.

Procedeu-se à análise da fase entre cada um dos cílios presentes na vesícula e ao estudo das suas diferenças de fase. Um exemplo de resultado pode ser observado nas figuras 4.9 e 4.10.



**Figura 4.9** - Gráficos das fases ao longo do tempo. **A.** Fases para o cílio 1 representado na figura 4.8 e **B.** fase para um cílio vizinho (cílio 2).



**Figura 4.10** - Diferença de fase para o cílio 1 e cílio 2. Podemos observar alguns momentos em que a diferença de fase aparenta ter um valor relativamente estável.

Através da observação do gráfico 4.10 podemos assinalar momentos em que os valores de diferença de fase aparentam ter um valor relativamente estável. Apesar disto quando estudados vários gráficos de diferentes cílios, verificam-se que estes momentos são comuns, mas aparentam ser de origem estocástica. Como tal, os resultados não foram conclusivos pelo que a abordagem foi posta de parte.

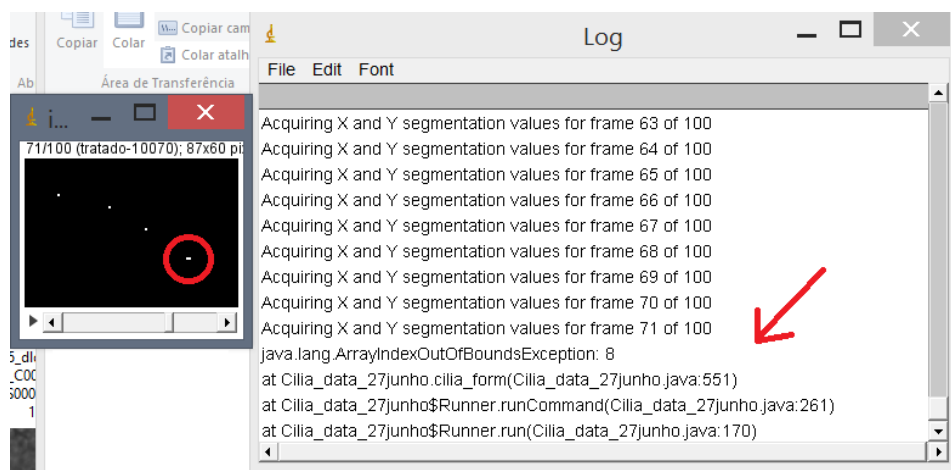
## 4.3 CARACTERIZAÇÃO DO MOVIMENTO CILIAR

### 4.3.1. Aquisição de dados para a caracterização do movimento

Como já foi descrito anteriormente, o utilizador selecciona quatro pontos/*frame* que irão segmentar o cílio. O *plugin* permite guardar estes pontos num documento de texto que será analisado em R.

O botão “*Set cilia limits*” permite que o utilizador indique as coordenadas do rectângulo que contém o cílio na imagem. Caso toda a imagem seja para analisar, o utilizador insere a dimensão da imagem. Por sua vez “*Get cilia movement*” vai adquirir todos os pontos de todas as *frames* e calcular a dimensão do cílio para cada uma. O ficheiro de texto final contém a indicação do rectângulo que foi analisado, as coordenadas x e y de cada um dos quatro pontos e a dimensão estimada para cada *frame*.

À medida que decorre a aquisição, uma janela de *log* (figura 4.11) é apresentada ao utilizador, com a indicação do número da *frame* onde se está a obter os pontos. Esta funcionalidade permite ao utilizador detectar em que *frame* existem píxeis a mais devido a artefactos.



**Figura 4.11** - Ponto com dois píxeis devido a artefacto e respectivo erro na janela de *log*. Nesta é apresentada a *frame* onde se encontra a decorrer a aquisição permitindo ao utilizador localizar o erro com facilidade.

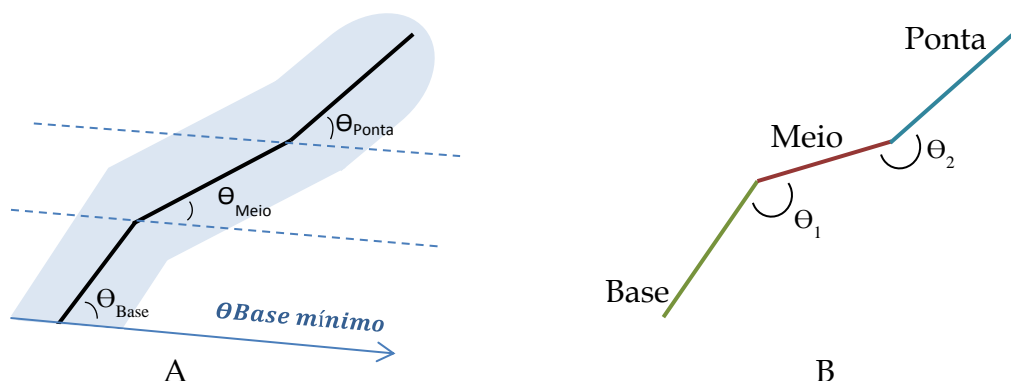


#### 4.1.1. Código R - Organização do código

O código R encontra-se organizado em rotinas. Nestas, encontram-se várias funções que vão ser chamadas a partir da rotina principal. Cada rotina diz respeito ao tipo de funções: funções de organização de dados, de gravação de dados ou de análise de dados. Existe ainda uma rotina com as bibliotecas utilizadas e com as constantes que vão ser utilizadas. Na rotina principal encontra-se o código que utiliza todas as funções.

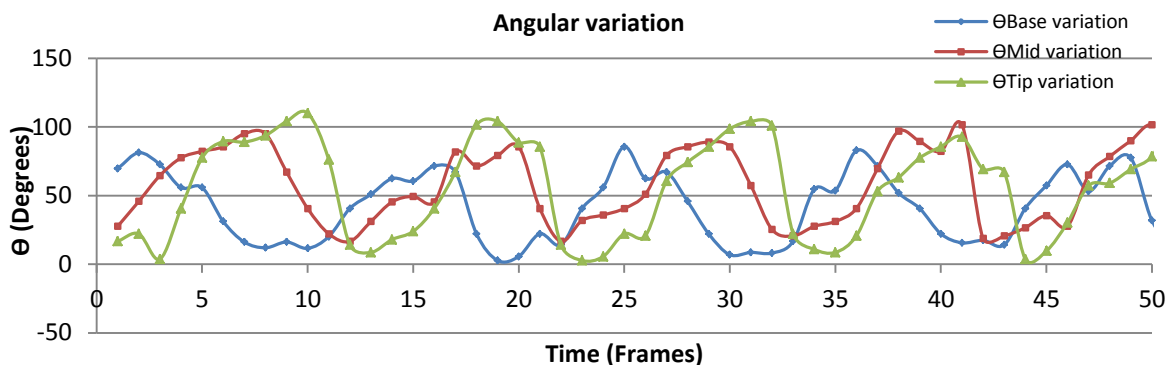
#### 4.1.2. Código R - Algoritmo

A análise da dinâmica do movimento ciliar envolve vários passos de tratamento dos dados. Cada *frame* vai ser organizada numa tabela com os valores (x,y) de cada um dos quatro pontos seleccionados manualmente. Primeiro os pontos devem estar ordenados segundo x, de modo a calcular correctamente a dimensão do cílio e a forma como este é dividido. Quando os pontos estiverem ordenados, calcula-se o comprimento do cílio em função do tempo e o declive de cada segmento. A partir daqui é calculada a variação dos ângulos com a horizontal e a variação dos ângulos entre cada segmento. A primeira (figura 4.12 A) toma como valor de referência o valor do ângulo mais baixo da base e calcula todos os outros ângulos em função deste. O segundo (figura 4.12 B) calcula a variação entre os ângulos formados pelos conjuntos base-meio e meio-ponta.

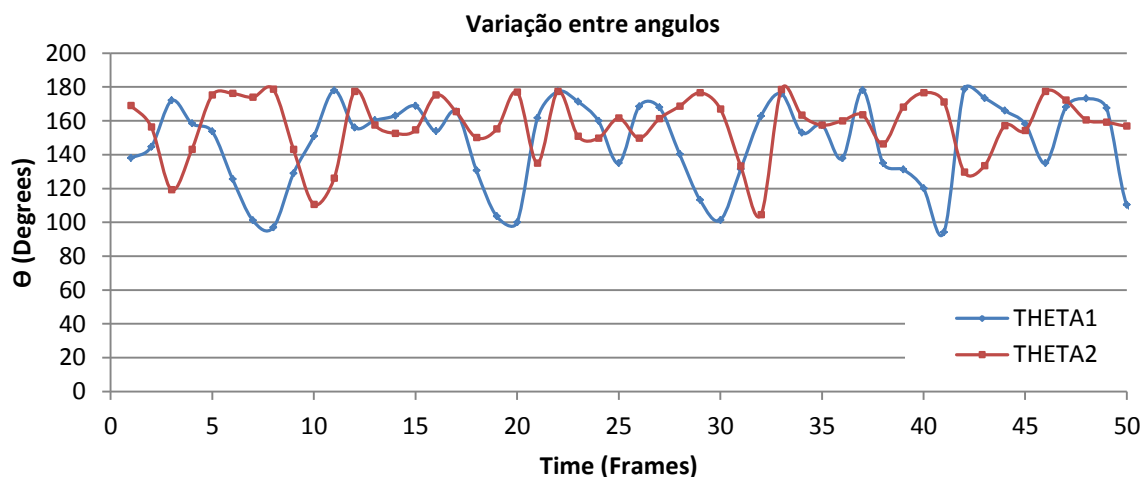


**Figuras 4.12-** **A.** Cílio com a variação dos ângulos com a horizontal (à esquerda) com a azul o ângulo de referência. **B.** À direita, ilustração do cílio com a variação entre os ângulos formados pelos conjuntos base-meio e meio-ponta.

Estas duas medidas permitem observar a forma como se comporta cada uma das porções do cílio ao longo do tempo (figura 4.13 e 4.14), designadamente se existe alguma rigidez no seu movimento, mesmo que esta não seja observável nos vídeos apenas por inspecção visual.



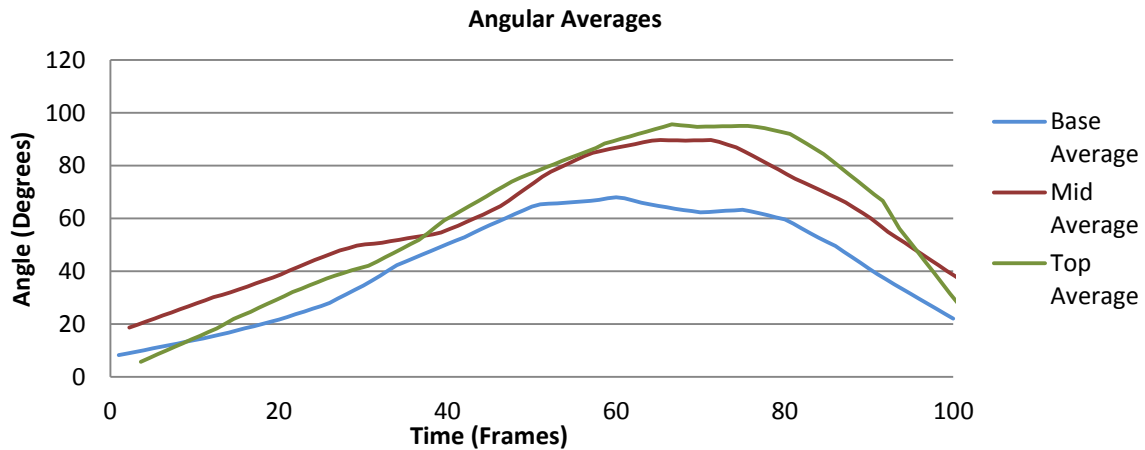
**Figura 4.13** - Exemplo da variação dos ângulos com a horizontal para um cílio normal ao longo do tempo (em frames). Para este exemplo estão apenas representadas 50 frames de um total de 100. É tomado como valor de referência o menor ângulo da base (neste caso  $\Theta_{ref} = -40.6^\circ$ ) e calcula-se os ângulos referentes ao meio e ponta em função deste.



**Figura 4.14** - Exemplo da variação entre ângulos para um cílio normal ao longo do tempo (em frames). Esta representa a variação entre os ângulos formados pelos conjuntos base-meio e meio-ponta, *THETA 1* e *THETA 2*, respectivamente.

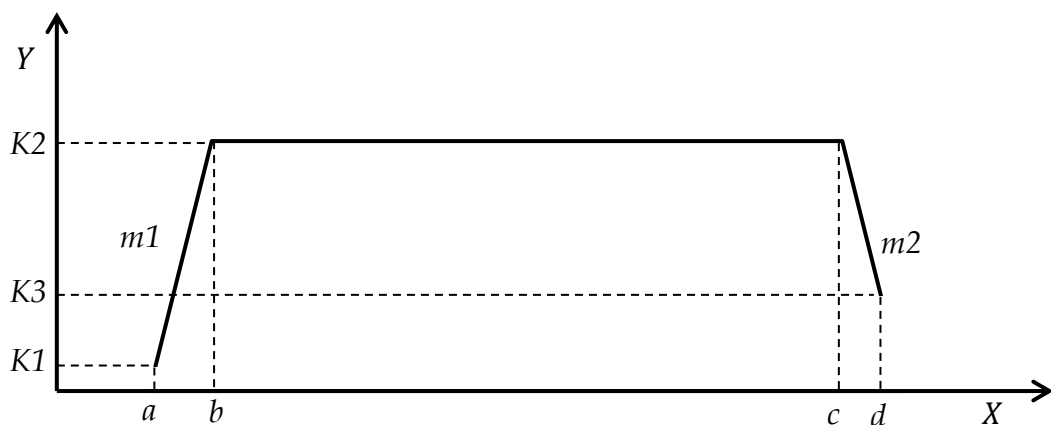
Como se pode observar o movimento dos cílios normais é, como se esperaria, caracterizado por um ciclo, onde ao movimento da base se segue o movi-

mento do meio e o movimento da ponta, de uma forma sequencial. As curvas que constituem a variação dos ângulos com a horizontal ao longo do tempo são seccionadas de acordo com os mínimos e cada uma das partes é interpolada com 100 valores. Para a base, meio e ponta são calculadas as médias (figura 4.15) destes sinais ficando com apenas uma onda para cada.



**Figura 4.15** – Exemplo de uma média calculada para uma variação angular em função do tempo em *frames*. A média é calculada determinando os mínimos das ondas e interpolando cada um dos segmentos em 100 pontos. Depois calcula-se a média ponto a ponto para o sinal. Este processo é realizado para a base, meio e ponta.

Para quantificar o movimento é realizada sobre estas médias uma modulação paramétrica com cinco parâmetros  $b, c, K1, K2, K3$ , representados na figura 4.16.



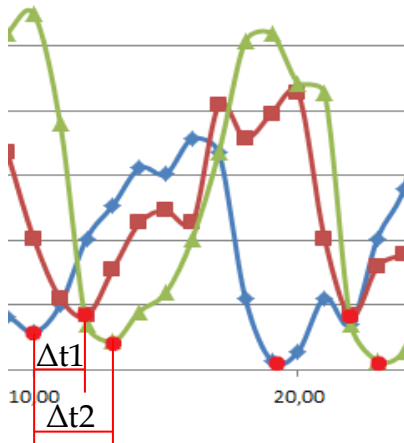
**Figura 4.16** – Modelo utilizado para parametrizar a curva média associada à variação angular da base, do meio e da ponta dos cílios. Os pontos  $a$  e  $d$  são o primeiro e último ponto da média, respectivamente, e não entram na parametrização.

Com os referidos parâmetros calcula-se o tempo de subida, de *plateau*, de descida, o valor do *plateau*, e os declives das rectas  $m_1$  e  $m_2$  sendo que:

$$\begin{aligned} t_{subida} &= b - a \\ t_{descida} &= d - c \\ t_{plateau} &= c - b \\ m_1 &= (K_2 - K_1)/t_{subida} \\ m_2 &= (K_3 - K_2)/t_{descida} \end{aligned}$$

Todos os valores são guardados em documentos de texto que podem ser importados para Excel e os gráficos guardados em .pdf .

Adicionalmente, também é analisado o atraso de cada parte do cílio face à base. Estas medidas, denominadas  $\Delta t_1$  e  $\Delta t_2$  (figura 4.17) são computadas através dos valores obtidos para o início do ciclo de cada componente do cílio.



**Figura 4.17** – Representação de  $\Delta t_1$  e  $\Delta t_2$  em parte de um gráfico (Figura 4.2) da variação dos ângulos com a horizontal.

Através da sua média podemos estimar a dinâmica do movimento ciliar.

$$\begin{aligned} \overline{\Delta t_1} &= \frac{\sum_{i=1}^N \Delta t_{1i}}{N} \\ \overline{\Delta t_2} &= \frac{\sum_{i=1}^N \Delta t_{2i}}{N} \end{aligned}$$

Em que  $i=1, \dots, N$  representa o número de mínimos obtidos para a base, meio e topo do cílio a partir do gráfico da variação dos ângulos com a horizontal.

De seguida efectua-se uma análise estatística para cada tipo de cílio de modo a perceber quais as diferenças entre cada um. Este tema será abordado na secção seguinte.

### 4.1.3. Análise Estatística

A ANOVA é uma ferramenta que, tal como já foi discutido anteriormente, permite a análise estatística da variância entre dois grupos. Neste caso, foi utilizada uma ANOVA de factor único pois assume-se que cada grupo de dados só é influenciado por um único factor. A análise estatística foi realizada com recurso ao Excel.

Os valores aos quais foi aplicada a ANOVA foram:  $\overline{\Delta t1}$ ,  $\overline{\Delta t2}$ ,  $m1$ ,  $m2$ , tempo de subida, tempo de descida, tempo de *plateau*, amplitude de *plateau* e também as diferenças de amplitude angular entre os segmentos meio-base e ponta-base.

Para cada um dos valores em questão foi calculada a média para cada tipo de cílio, ponderando-se as hipóteses:

$$H0: \text{Média cílio tipo 1} = \text{Média cílio tipo 2}$$

$$H1: \text{Média cílio tipo 1} \neq \text{Média cílio tipo 2}$$

Caso se verificasse a hipótese  $H0$ , podemos afirmar que, estatisticamente, não existem diferenças para aquele valor, sendo que o movimento ciliar é semelhante nesse aspecto. Se a hipótese  $H1$  se demonstrar verdadeira então o movimento ciliar é diferente para aquele valor.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Amostra

Foram recolhidos vídeos de 32 cílios de 21 filmes, com 512 frames cada um. Destes 32, 8 cílios eram normais, sem nenhuma alteração, 8 tinham subexpressão de Pkd2, 9 tinham sobreexpressão de Arl13b e 7 tinham uma mutação no gene deltaD.

Na tabela 5.1 encontra-se a listagem dos cílios analisados bem como o vídeo a que pertencem.

**Tabela 5.1** – Listagem da Amostra utilizada. As primeiras duas letras do nome dos vídeos indicam o embrião usado para filmar a vesícula e as duas seguintes, quando existem, indicam qual o cílio analisado no vídeo.

Cílio	Alteração	Cílio	Alteração
A1	Não existente	E2	Sobreexpressão de Arl13b
A2		E1	
A3		E4_C1	
B1_C1		E4_C2	
B1_C2		E4_C3	
B4		E6_C1	
C1		E6_C2	
MovieS5		E6_C3	
A2		E7	
A5_C1	Subexpressão de Pkd2	A2	Mutação no gene deltaD
A5_C2		A4	
A5_C3		A5	
B1_C1		A6_2_C1	
B1_C2		A6_2_C2	
B1_C3		A6_3_C1	
B4		A6_3_C2	

Foram comparados estatisticamente os grupos de cílios normais e cílios alterados (tabela 5.2).

**Tabela 5.2-** Tipos de cílios comparados com ANOVA factor único.

Cílio tipo 1	Cílio tipo 2
Normais	Pkd2
Normais	Arl13b
Normais	DeltaD

## 5.2 Frequência

A frequência foi calculada para os 32 cílios quer utilizando a imagem toda, quer utilizando só um píxel. Este processo permitiu a validação do resultado por duas vias diferentes bem como a determinação de quais dos cílios eram do tipo *wobbling* [24]. Esta última análise só é possível com o cálculo da frequência para um píxel tendo em conta, como já foi discutido, que considerando a totalidade da imagem embora se tenha uma visão global da distribuição das frequências, a escolha da frequência característica dos cílios é menos óbvia.

Os resultados obtidos entram em acordo com o que era já descrito por Sampaio et. al. 2014 [24], com valores entre os 20 e 40 hertz. A média obtida para toda a amostra foi de 34,9 Hz. (tabela 5.3)

**Tabela 5.3** – Média da frequência obtida para cada tipo de cílio. A média total obtida foi de 34,9 Hz. Os valores encontram-se todos dentro do intervalo esperado comparando com os resultados descritos por Sampaio et. al. 2014. [24]

Tipo de Cílio	Frequência média (Hz)	$\sigma$ (Hz)
Normais	39,1	5,2
Pkd2	32,0	2,0
Arl13b	31,5	2,6
DeltaD	37,2	2,5

Os resultados individuais para cada cílio encontram-se no Anexo II.

Foi encontrado um cílio *wobbling*, com uma frequência secundária de 11,7 Hz para além da primária de 28,3 Hz. Este foi identificado por um padrão de bati-



mento irregular, observado no quimógrafo e, posteriormente, pelo cálculo da frequência.

A análise estatística destes resultados mostrou que 2 dos tipos mutantes possuem frequências estatisticamente diferentes dos cílios normais, com um intervalo de confiança de 95% (tabela 5.4).

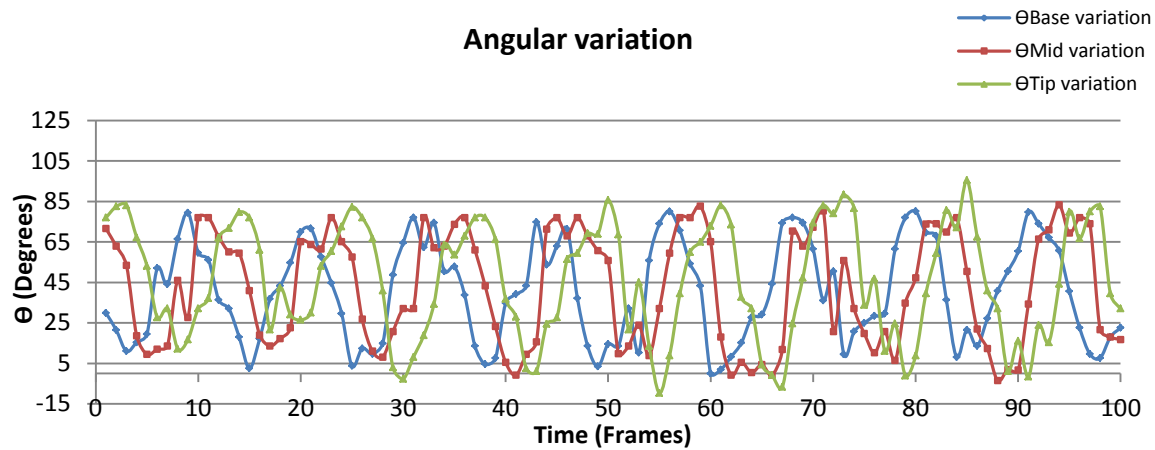
**Tabela 5.4** - Análise ANOVA ( $\alpha=0.05$ ) às frequências ciliares.

<b>Conjunto analisado</b>	<b><i>F</i></b>	<b><i>F crítico</i></b>
Normais/ Pkd2	11,43	4,60
Normais/ Arl13b	13,28	4,54
Normais/ DeltaD	0,62	4,67

Podemos verificar que, para esta amostra, os cílios com subexpressão de Pkd2 e sobreexpressão de Arl13b possuem, respectivamente, frequências 18% e 19% inferiores, quando comparadas com os cílios normais.

### 5.3 Movimento Ciliar

O estudo do movimento ciliar englobou vários factores conforme discutido no capítulo anterior e a sua respectiva análise estatística. Todos os resultados obtidos completos podem ser consultados no anexo III. Os gráficos da variação angular permitiram visualizar as diferenças entre os cílios normais e os cílios com alterações. Todos os cílios possuem um movimento cíclico com a sequência base→meio→ponta. Nos cílios normais (figura 5.1) observa-se que esta sequência é uma progressão bem definida, caracterizada por um espaçamento observável entre as ondas.



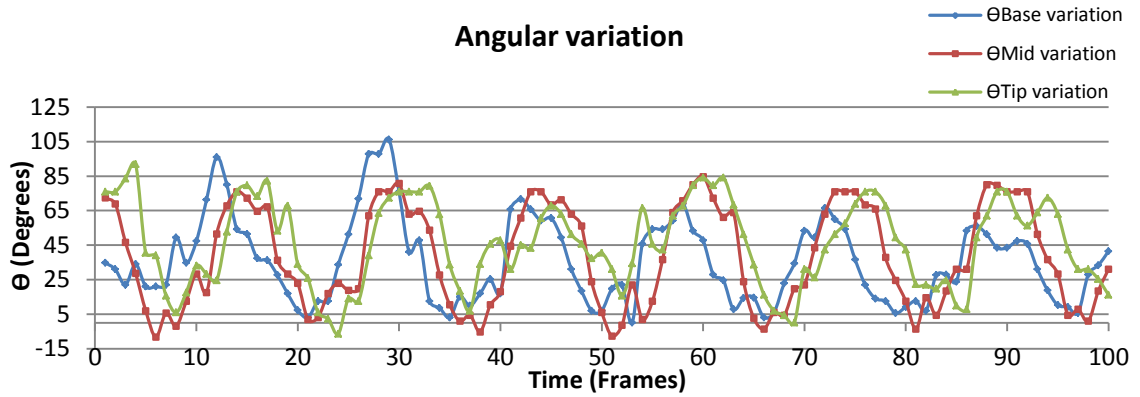
**Figura 5.1-** Variação angular para um cílio normal. Podemos observar um movimento cíclico do tipo base (azul)→meio (vermelho)→ponta (verde) com um espaçamento claro entre ondas.

Através dos valores médios para cada vídeo de  $\Delta t1$  e  $\Delta t2$  podemos estimar o atraso médio entre o movimento de cada segmento. Na tabela 5.5 encontram-se os valores médios calculados para  $\Delta t1$ ,  $\Delta t2$ ,  $m1, m2$ , tempos de subida, descida e *plateau* e a amplitude.

**Tabela 5.5** – Tabela de valores médios para os cílios normais.

$\Delta t1$ (frames)					$\sigma_{\Delta t1} = 1,60$	
$\Delta t2$ (frames)					$\sigma_{\Delta t2} = 2,17$	
$\bar{x}$	Base	$\sigma$ Base	Meio	$\sigma$ Meio	Topo	$\sigma$ Topo
$m1$ (graus/frames)	1,36	0,34	1,70	0,32	1,47	0,35
$m2$ (graus/frames)	-1,18	0,35	-1,50	0,39	-1,49	0,40
$t_{subida}$ (frames)	44,35	10,88	39,50	7,44	43,22	8,78
$t_{descida}$ (frames)	40,85	11,88	38,08	6,94	33,25	4,82
$t_{plateau}$ (frames)	14,26	8,87	20,44	6,27	21,35	8,65
Amplitude (graus)	65,78	2,45	66,92	11,23	64,42	15,63

Nos cílios com subexpressão da proteína Pkd2 (figura 5.2), os valores de  $\Delta t1$  e  $\Delta t2$  (tabela 5.6) são inferiores aos valores correspondentes aos cílios normais, sendo que aparenta existir uma sobreposição entre as ondas que caracterizam a dinâmica. Se considerarmos que estes gráficos (figura 5.2) nos dão a variação angular de cada um dos segmentos constituintes do cílio, podemos prever que este tipo de cílio possuirá uma maior rigidez que os cílios normais.



**Figura 5.2** – Variação angular com a horizontal para um cílio com subexpressão da proteína Pkd2. É visível um menor atraso entre as ondas, o que denota uma certa rigidez no seu movimento.

**Tabela 5.6**– Valores médios para cílios com subexpressão de Pkd2. De notar a diferença nos valores de  $\Delta t1$  e  $\Delta t2$  face aos valores normais.

$\Delta t1$ (frames)					$\sigma_{\Delta t1} = 1,67$	
$\Delta t2$ (frames)					$\sigma_{\Delta t2} = 1,85$	
$\bar{x}$	Base	$\sigma_{Base}$	Meio	$\sigma_{Meio}$	Topo	$\sigma_{Topo}$
$m1(\text{graus/frames})$	1,67	0,60	2,03	0,35	1,50	0,29
$m2(\text{graus/frames})$	-1,24	0,26	-1,81	0,37	-1,98	0,57
$t_{subida}$ (frames)	40,95	7,03	39,27	4,95	44,77	6,67
$t_{descida}$ (frames)	49,04	6,95	37,10	6,88	32,04	7,77
$t_{plateau}$ (frames)	9,01	4,40	22,63	6,85	22,20	6,17
Amplitude (graus)	68,98	10,95	74,08	8,50	77,08	8,46

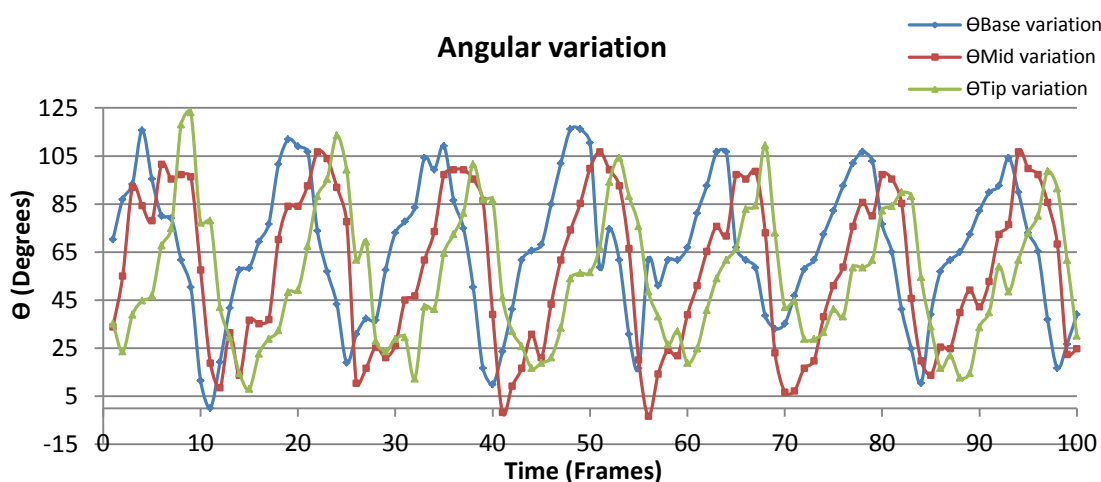
Efectivamente, grande parte dos valores médios para cílios com subexpressão da proteína Pkd2 não diferem estatisticamente dos cílios normais. Apesar disto os valores de  $\Delta t1$  e  $\Delta t2$  provaram ser, em média, 60% inferiores relativamente aos valores para cílios normais com um intervalo de confiança de 95%. (Tabela 5.7) No anexo IV podem ser consultados os resultados da ANOVA aplicada às restantes variáveis.

**Tabela 5.7** - Resultados ANOVA ( $\alpha=0.05$ ) dos valores  $\Delta t1$  e  $\Delta t2$  para os grupos Normais/Pkd2.

Normais/Pkd2	<i>F</i>	<i>F crítico</i>
$\Delta t1$	10,98	3,94
$\Delta t2$	26,66	3,94

A análise da variação angular base-meio e meio-ponta (figura 4.9 A) foi feita através do estudo da variância dos sinais obtidos. Os cílios com subexpressão de Pkd2 foram os únicos a diferirem dos normais estatisticamente. O ângulo  $\Theta 2$  é inferior à dos cílios normais com um intervalo de confiança de 95% (Anexo IV).

No caso de cílios com sobreexpressão da proteína Arl13b (figura 5.3), já não se observam alterações a nível do espaçamento, conforme se pode confirmar na tabela 5.8.



**Figura 5.3** – Variação angular para um cílio com sobreexpressão da proteína Arl13b. O espaçamento entre cada onda é semelhante ao do cílio normal, no entanto este possui uma amplitude angular superior.

Quando comparados com os cílios normais, os cílios Arl13b aparentam uma maior amplitude angular, implicando que estes cílios deverão ter oscilações mais acentuadas que os restantes. Como estes cílios possuem dimensões superiores ao normal, é possível que seja um mecanismo de compensação para manter o fluxo da vesícula o mais normalizado possível. A amplitude de cada um dos componentes do cílio foi considerada superior à componente respectiva dos cílios normais com um intervalo de confiança de 90%, como pode ser observado na tabela 5.9 (Anexo IV). Em média, as amplitudes angulares para cílios Arl13b são 26% superiores quando comparados com os cílios normais.

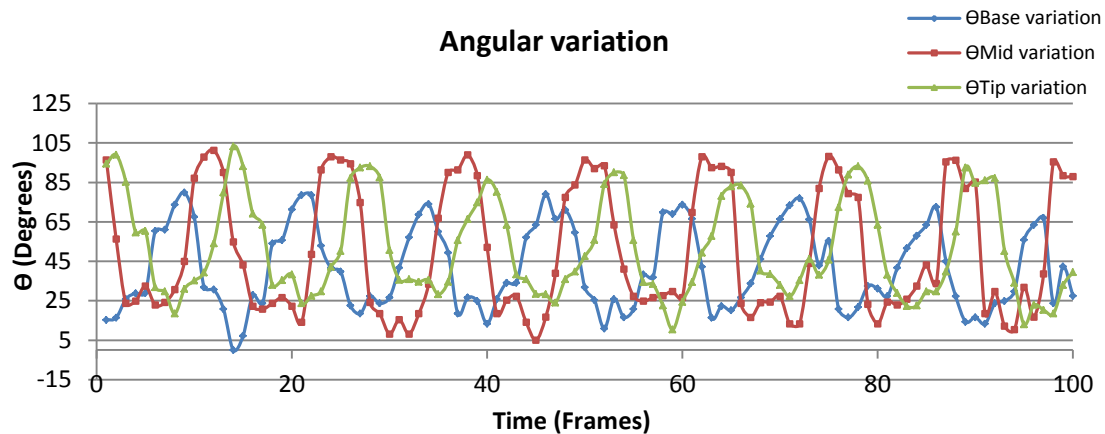
**Tabela 5.8** - Valores médios para cílios com sobreexpressão de Arl13b.

<b><math>\Delta t1</math> (frames)</b>					<b><math>\sigma_{\Delta t1} = 1,67</math></b>	
<b><math>\Delta t2</math> (frames)</b>					<b><math>\sigma_{\Delta t2} = 1,77</math></b>	
<b><math>\bar{x}</math></b>	<b>Base</b>	<b><math>\sigma_{\text{Base}}</math></b>	<b>Meio</b>	<b><math>\sigma_{\text{Meio}}</math></b>	<b>Topo</b>	<b><math>\sigma_{\text{Topo}}</math></b>
<i>m1(graus/frames)</i>	1,59	0,59	1,78	0,22	1,71	0,36
<i>m2(graus/frames)</i>	-1,43	0,53	-2,02	0,84	-2,08	0,47
<i>t<sub>subida</sub> (frames)</i>	41,63	10,49	46,81	10,24	44,75	6,86
<i>t<sub>descida</sub> (frames)</i>	40,87	9,60	34,95	9,42	30,56	9,51
<i>t<sub>plateau</sub> (frames)</i>	16,50	8,66	17,24	7,02	23,78	10,73
<i>Amplitude (graus)</i>	76,30	9,60	88,31	9,42	84,28	9,51

**Tabela 5.9** - Teste ANOVA para a amplitude de cílios normais/Arl13b

<b>Normais/Arl13b</b>	<b><i>F</i></b>	<b><i>F crítico</i></b>
<b>Base (<math>\alpha=0.1</math>)</b>	3,70	3,07
<b>Meio (<math>\alpha=0.05</math>)</b>	10,81	4,54
<b>Topo (<math>\alpha=0.05</math>)</b>	5,14	4,54

Os cílios com mutação no gene deltaD (figura 5.4) por sua vez não apresentam diferenças significativas, quando comparados com os cílios normais. Possuem uma progressão normal tal como foi observado para os Arl13b, como podemos verificar na tabela 5.10.



**Figura 5.4** - Variação angular para um cílio com mutação no gene deltaD. Apresentam uma progressão do movimento semelhante aos cílios normais, mas a diferença de amplitudes entre a base e meio do cílio é superior à dos cílios normal

**Tabela 5.10** - Valores médios para cílios com mutação DeltaD.

$\Delta t1$ (frames)					$\sigma_{\Delta t1} = 1,49$	
$\Delta t2$ (frames)					$\sigma_{\Delta t2} = 1,74$	
$\bar{x}$	<b>Base</b>	$\sigma_{\text{Base}}$	<b>Meio</b>	$\sigma_{\text{Meio}}$	<b>Topo</b>	$\sigma_{\text{Topo}}$
$m1(\text{graus/frames})$	1,33	0,35	1,56	0,35	1,36	0,56
$m2(\text{graus/frames})$	-1,17	0,23	-1,71	0,47	-1,50	0,38
$t_{\text{subida}}(\text{frames})$	40,91	8,46	47,42	8,24	43,55	11,58
$t_{\text{descida}}(\text{frames})$	38,69	3,78	31,16	9,11	24,93	4,53
$t_{\text{plateau}}(\text{frames})$	19,40	5,50	22,42	10,86	30,52	14,39
<b>Amplitude (graus)</b>	64,46	8,60	77,39	13,25	70,54	17,77

A análise estatística revela porém, com um intervalo de confiança de 95%, que estes cílios possuem um tempo de descida inferior relativamente aos cílios normais. Estes cílios possuem um comprimento inferior ao normal, pelo que um tempo de descida inferior na ponta do cílio poderá estar relacionado com as forças de atrito do interior da vesícula. Como a superfície de contacto com o fluido no interior da vesícula é inferior e se a força exercida pelo cílio for a mesma que para os cílios normais, este irá encontrar menos resistência ao movimento.

Apesar dos valores normais das amplitudes ciliares dos cílios mutados para DeltaD com a análise gráfica das variações angulares, supôs-se que houvesse uma desigualdade entre a relação na amplitude entre a base e o meio do cílio ou entre a base e a ponta relativamente aos cílios normais. (Ver imagem 5.4). Por este motivo, analisou-se também estatisticamente as quantidades (tabela 5.11):

1. Amplitude (Meio/Base) = Amplitude meio/Amplitude base
2. Amplitude (Topo/Meio) = Amplitude topo/Amplitude meio

A diferença de amplitudes do ponto 1 foi verificada pela ANOVA, que com um intervalo de confiança de 95% determinou que efectivamente existe uma diferença, em média, de 23% na razão meio/base das amplitudes entre os cílios mutados e os normais. (Anexo IV).

**Tabela 5.11** – Médias da relação entre amplitudes para cílios normais e cílios com mutação no gene deltaD.

	<i>Amplitude (Meio/Base)</i> (graus)	$\sigma$ <i>Meio/base</i>	<i>Amplitude (Topo/Meio)</i> (graus)	$\sigma$ <i>Topo/meio</i>
Normais	0,98	0,15	0,94	0,14
DeltaD	1,21	0,16	0,91	0,15





## 6. CONCLUSÕES

O uso de vídeos de microscopia electrónica aliado a ferramentas de aquisição de dados permitiu observar diferenças entre cílios normais e cílios com alterações genéticas. Foi possível quantificar parte do movimento ciliar e obter resultados que, apesar de preliminares, permitem abrir caminho para o estudo dos processos que ocorrem na vesícula de Kupffer.

Os cílios possuem um movimento caracterizado por um ciclo com uma sequência base→meio→ponta. Em geral, esta ordem é bem definida e o movimento flexível, permitindo uma subida da base, seguida do meio e a ponta. As ferramentas desenvolvidas neste trabalho e a sua aplicação a uma amostra de cílios normais e geneticamente modificados, permitiu verificar que cílios com subexpressão da Pkd2 se caracterizam por uma certa rigidez (cerca de 60% superior comparativamente aos cílios normais), em que cada uma das partes ciliares se move quase como um todo. Sugere-se que essa rigidez possa estar, de alguma forma, relacionada com a falta de sensibilidade destes cílios ao fluxo gerado na vesícula, ou até à diferença na estrutura na membrana ciliar que a falta dos sensores de movimento possa causar.

Os cílios com sobreexpressão da proteína Arl13b possuem comprimentos superiores aos cílios normais, sendo que o seu movimento tem amplitudes superiores, nomeadamente na ponta do cílio, onde atinge valores, em média, 26% superiores ao normal. Por fim, cílios com mutação no gene deltaD têm um comprimento inferior ao normal e produzem um fluxo mais lento, sendo que a relação entre as amplitudes da base e do meio é, em média 23%, superior quando comparada com os demais.

É necessário analisar mais cílios, de modo a ter resultados mais sólidos visto que existe uma grande variabilidade de dimensões ciliares existentes den-

tro da vesícula. De futuro será importante também melhorar toda a metodologia utilizada, nomeadamente na criação de um algoritmo que consiga analisar não só o movimento dos cílios apenas quando estes se encontram em posições laterais, mas também quando os mesmos estão, por exemplo, na posição de topo.

Finalmente, espera-se que esta ferramenta, concebida para ser utilizada com programas já existentes no CEDOC@ICG, venha a permitir ao grupo uma nova abordagem para o estudo dos cílios de peixe-zebra. Os resultados obtidos estão a ser utilizados em alguns trabalhos a decorrer neste momento, visto que todos os cílios analisados foram recolhidos de vídeos que estão a ser utilizados para investigação dos efeitos das diversas alterações ciliares.

## Bibliografia

1. Inés Ibañez-Tallon, Svetlana Gorokhova, Nathaniel Heintz, Loss of function of axonemal dynein Mdnah5 causes primary ciliary dyskinesia and hydrocephalus. 2002. Oxford University Press. Human Molecular Genetics Vol. 11 No. 6.
2. Barbato A, et al. Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children. 2009. Eur Respir J 2009; 34: 1264–1276. Doi. 10.1183/0.9031936.00176608. ERS Journals. Disponível em: <http://www.ers-education.org/IrMedia/2009/pdf/104555.pdf>
3. Andrew Bush, et al. Primary Ciliary Dyskinesia: Current State of the Art. 92(12):1136-1140. doi: 10.1136/adc.2006.096958. Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2066071/pdf/1136.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2066071/pdf/1136.pdf)
4. Tomoko Obara, Steven Mangos, Yan Liu, Jinhua Zhao, Stephanie Wiessner, Albrecht G. Kramer-Zucker, Felix Olale, Alexander F. Schier, and Iain A. Drummond. Polycystin-2 Immunolocalization and Function in Zebrafish . JASN October 2006 17: 2706-2718; 2006, doi:10.1681/ASN.2006040412
5. Uniprot.org - Q8UWJ4. Acedido a dia 27 de Agosto de 2014
6. Sampaio, Pedro; Ferreira, Rita; Guerreiro, Adán; Petra, Pintado; Tavares, Bárbara; Amaro, Joana; Smith A., Andrew, Montenegro-Johnson, Thomas; Smith, David; Lopes, Susana; Left-Rigth Organizer Flow Dynamics: How Much Cilia Activity Realibly Yeilds Laterality?;Developmental Cell (2014);<http://dx.doi.org/10.1016/devcel.2014.04.030>
7. Elizabeth F. Smith, Regulation of Flagellar Dynein by Calcium and a Role for an Axonemal Calmodulin and Calmodulin-dependent Kinase. 2002. Mol Biol Cell. 13(9): 3303– 3313. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC124160/#\\_\\_ffn\\_sectitle](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC124160/#__ffn_sectitle)
8. KING, Stephen, PAZOUR, Gregory; Cilia: Motor and Regulation; Methond in Cell Biology – Volume 92; Academic Press, 01/12/2009. Capitulo 11 – Calcium Regulation of Ciliary Motility: Analysis of Axonemal Calcium-Binding Proteins. Páginas 174-176.

9. Algoritmo em Matlab, adaptado para código R, presente em [mathworks.com/help/signal/ref/hilbert.html](http://mathworks.com/help/signal/ref/hilbert.html), acessado a 12 de Maio de 2014.
10. *Explorable*: ANOVA; <https://explorable.com/anova>. Acessado a dia 7 de Novembro de 2014
11. FishBase.org: Danio-rerio; <http://www.fishbase.org/summary/Danio-rerio.html>. Acessado 15 de Janeiro de 2013.
12. Kimmel C, W Ballard, S Kimmel, B Ullmann, T Schilling. Stages of Embryonic development of the Zebrafish. *Developmental dynamics*. 1995. p. 258 , 253-310. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aja.1002030302/pdf>.
13. Lopes, Susana S; Lourenço, Raquel; Pacheco, Luís; Moreno, Nuno; Kreiling, Jill; Saúde, Leonor. 2010. Notch signalling regulates left-right asymmetry through ciliary length control. *Development* (Cambridge, England). doi:10.1242/dev.054452. Disponível em: <http://dev.biologists.org/content/137/21/3625.full>.
14. Claire M Smith, et al. ciliaFA: a research tool for automated, high-throughput measurement of ciliary beat frequency using freely available software. Smith et al. *Cilia* 2012, 1:14. <http://www.ciliajournal.com/content/1/1/14>
15. Jana Djakow, Tamara Svobodová, Karel Hrach, Jiří Uhlík, Ondřej Cinek, Petr Pohunek. Effectiveness of sequencing selected exons of DNAH5 and DNAI1 in diagnosis of primary ciliary dyskinesia. 2012. *Pediatric Pulmonology*. p. 864–75. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ppul.22520/abstract>
16. Peter Satir, Søren T. Christensen. Structure and function of mammalian cilia. 2008. *Histochemistry and Cell Biology*. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00418-008-0416-9>
17. Horne N , et al. DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects. 2006. *Am J Respir Crit Care Med*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16627867>
18. M K Wagner, H J Yost. Left-right development: the roles of nodal cilia. *Current biology* : 2000.

19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2867295/>
20. Matthew J Wargo, Erin E Dymek, Elizabeth F Smith. Calmodulin and PF6 are components of a complex that localizes to the C1 microtubule of the flagellar central apparatus. 2005. Journal of cell science. Disponível em: [jcs.biologists.org/content/118/20/4655.long](http://jcs.biologists.org/content/118/20/4655.long)
21. KING, Stephen, PAZOUR, Gregory; Cilia: Motor and Regulation; Methond in Cell Biology – Volume 92; Academic Press, 01/12/2009. Capítulo 11 – Calcium Regulation of Ciliary Motility: Analysis of Axonemal Calcium-Binding Proteins. Páginas 174-176.
22. Mary A. K. Olm, João E. Kögler, Mariangela Macchione, Amelia Shoemark, Paulo H. N. Saldiva, Joaquim C. Rodrigues. Primary ciliary dyskinesia: evaluation using cilia beat frequency assessment via spectral analysis of digital microscopy images. 2011. Journal of Applied Physiology. p. 295–302. Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21551013](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21551013).
23. The Human gene compendium - GeneCards.com. Acedido para o DNAH5, DNAI1 e KTU.
24. Wendy Stannard, Andrew Rutman, Colin Wallis, Chris O'Callaghan, Central Microtubular Agenesis Causing Primary Ciliary Dyskinesia. 2004. Am J Respir Crit Care Med Vol 169. pp 634–637, 2004 DOI: 10.1164/rccm.200306-782OC
25. Margaret W Leigh, Maimoona A Zariwala, Michael R Knowles. Primary ciliary dyskinesia: improving the diagnostic approach. Current opinion in pediatrics. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3665363/>
26. Patton, E. Elizabeth; Zon, Leonard. The art and design of genetic screens: zebrafish. Nature Reviews Genetics. 2001. p. 956–66. Disponível em: <http://www.nature.com/nrg/journal/v2/n12/full/nrg1201-956a.html>
27. Brittijn SA, Duivesteyn SJ, Belmamoune M, Bertens LF, Bitter W, de Bruijn JD, et al. Zebrafish development and regeneration: New tools for biomedical research. Int J Dev Biol 2009;53:835 – 850. Disponível: [ijdb.ehu.es/web/paper.php?doi=10.1387/ijdb.082615sb](http://ijdb.ehu.es/web/paper.php?doi=10.1387/ijdb.082615sb).

28. Mohammadreza Yadollahi, Ales Prochazka, Image segmentation for object detection, Institute of Chemical Technology, Department of Computing and Control Engineering. Disponível em:  
[dsp.vsch.cz/konference\\_matlab/MATLAB11/prispveky/129\\_yadollahi.pdf](http://dsp.vsch.cz/konference_matlab/MATLAB11/prispveky/129_yadollahi.pdf).
29. G. Pals, Diagnosis and molecular background of Primary Ciliary Dyskinesia: a review of current literature. R.W.F. Lim, 0995452. Disponível em:  
[http://www.p-c-d.org/en/articles/Diagnosis\\_and\\_molecular\\_backgrounds\\_of\\_Primary\\_Ciliary\\_Dyskinesia\\_191101.pdf](http://www.p-c-d.org/en/articles/Diagnosis_and_molecular_backgrounds_of_Primary_Ciliary_Dyskinesia_191101.pdf)


## ANEXO I Protocolo

### 1. Pré-processamento

O vídeo deverá estar sob a forma de sequência de imagens, RGB, e deverá ter, no máximo, 512 frames ( $2^n, n=9$ ).

No programa *ImageJ*, correr, sem abrir a sequência, a macro “Tratamento”. De seguida ser-lhe-á pedido para abrir a sequência de imagens a tratar.

*Menu Plugins->Macro->Run->Seleccionar a macro "Tratamento"*

Seleccionar o cílio a ser analisado através da ferramenta seleccionar . Preferencialmente deverá tentar-se que a forma seja a de um quadrado. Recortar o ROI no menu *Image->Crop* (Ctrl+Shift+X).

A imagem do cílio deve estar posicionada de modo a que a base do cílio se encontre virada para a esquerda e o mais próximo do canto inferior esquerdo. (figura 1) O cílio deverá estar posicionado de tal forma que, no seu movimento, não atinja a verticalidade, para evitar declives infinitos “Div/0”.

Para tal recorre-se às ferramentas do menu *Image->Transform->Flip Horizontal/Flip Vertical/Rotate 90º Right/Rotate 90º Left*.

#### Exemplo

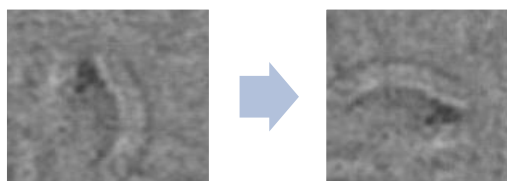


Figura 1 – Rotação de um cílio

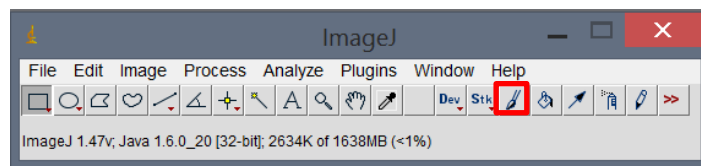
### 2. Estudo do movimento ciliar

#### a. Aquisição dos pontos no *ImageJ*

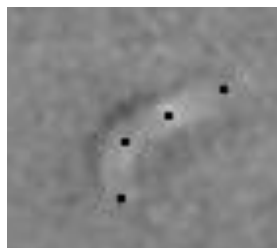
Das 512 frames seleccionar as desejadas para efectuar a aquisição de pontos (100 ou mais).

Depois de efectuado o pré-processamento, através da ferramenta *Paintbrush* (figura 2) desenhar quatro pontos para segmentar o movimento do cílio. (figura 3) Deverá ter em atenção a distância entre os pontos bem como os pontos de inflexão do cílio. Sempre que possível, os pontos deverão ter uma distância similar entre si, excepto em casos que a sinuosidade do movimento do cílio não o permita, visto que se deve tentar reproduzir o mais fielmente possível a curvatura do cílio. De modo a facilitar, poderá seleccionar primeiro os pontos principais para todas as *frames*, base e ponta, e depois marcar os dois restantes.

Estes pontos deverão ter uma cor distinta da imagem, isto é, se a imagem for clara utilizam-se pontos pretos. Caso seja escura utilizam-se brancos. Deverão ainda ter de dimensão mínima de 5 píxels (dimensões  $n+1$ , com  $n \geq 4$ ). Se for preciso recorre-se a uma mudança de contraste na imagem (*Ctrl+Shift+C*).



**Figura 2** – Paintbrush Tool. Ao clicar duas vezes abre-se o menu que permite alterar a cor e o tamanho da mesma.



**Figura 3** – Exemplo de segmentação

Seleccionar os quatro pontos para todas as *frames*. Caso se engane, utilize para corrigir a cor oposta à que está a utilizar, i.e., se os seus pontos forem brancos, pinte de preto o ponto errado.

Abrir o menu *Image->Adjust->Threshold Color* e escolha o Thresholding method “Otsu”, Threshold color “B&W” e ajuste as barras correspondentes ao gráfico “Brightness” de modo a que só fiquem visíveis os quatro pontos na imagem. De seguida clicar em “Stack” para que seja aplicado a todas as imagens na sequência.



Existe a possibilidade de ocorrência de artefactos (figura 4) devido ao mau ajuste dos parâmetros do *Threshold color*. Para os corrigir basta pintar todos os artefactos de preto.



Figura 4 - Artefacto

Em *Image -> Type* seleccionar a opção **8-bits**. No menu *Process*, seleccionar a opção *Binary* e de seguida *Skeletonize*. Corra a sequência de modo a verificar que não existem mais que 4 píxeis por *frame*. Se sim, apague-os do mesmo modo que aos artefactos.

Volte a ir a *Image->Type* e escolha a opção **RBG Color**.

No menu *Plugins*, seleccionar o plugin “CiliaData”. Numa primeira instância ser-lhe-á pedida a taxa de amostragem a que foi gravado o vídeo. A seguir deverá definir os limites do cílio na sua imagem em *Set Cilia Limits*. Por norma, como já seleccionou a área onde o cílio se encontra, deverá escrever apenas os limites relativos ao canto superior direito da imagem. Por exemplo, se a imagem tiver 85x71 px, deverá colocar 0,0,85,71 (figura 5).

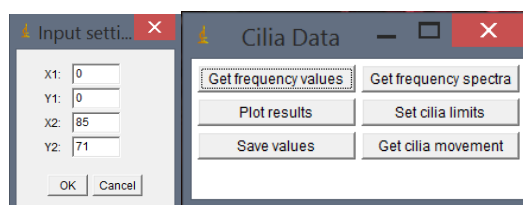
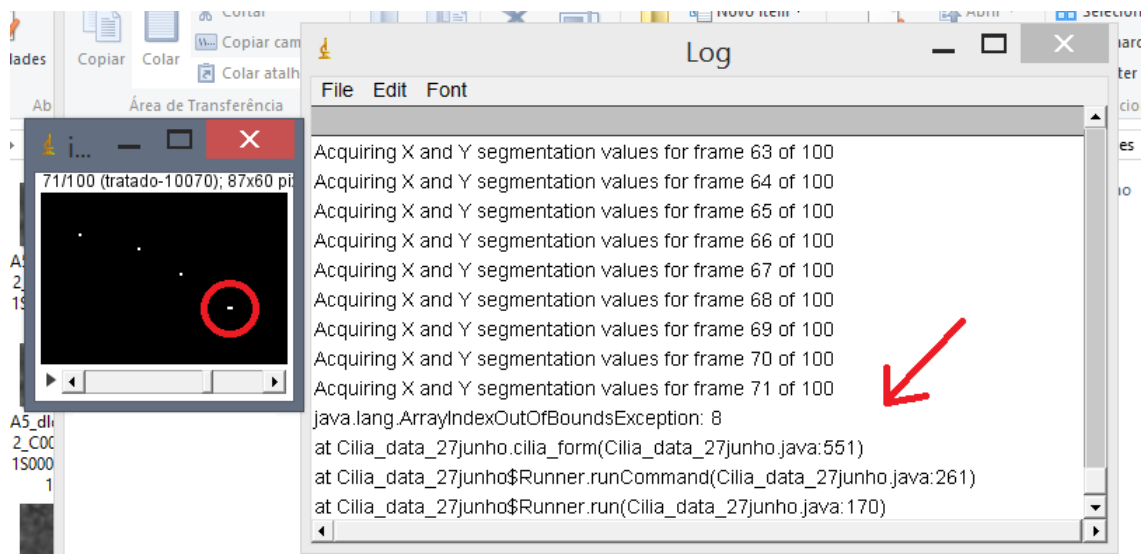


Figura 5 – Exemplo do plugin e *input* de limites do cílio

De seguida seleccionar a opção **Get Cilia Movement**. Deverá escrever qual o local onde quer que o seu ficheiro de texto seja guardado. Após inserir uma localização válida e carregar em *OK*, inicia-se a aquisição dos pontos, que é acompanhada por uma janela de *log* que o informa qual a *frame* a ser lida e se existe algum erro.

Quando haja mais que quatro píxeis por *frame*, o programa encerra com uma mensagem de erro no *log*, e a *frame* onde tal ocorre é a última da janela. (figura 6) Deverá corrigir a situação e voltar a carregar em **Get Cilia Movement**. Serão criados dois ficheiros de texto, mas o correcto será aquele que possui uma data mais recente (figura 6).



**Figura 6** - Ponto da segmentação com dois píxeis e respectivo erro na janela de *log*.

## b. Análise de pontos em R

O ficheiro resultante será utilizado para efectuar a análise em R. Abrindo o código R com nome *R\_código\_movimento* comece por definir as constantes. A constante principal a definir é a do directório na linha **17**, que vai definir onde se guardam os ficheiros que vão resultar da recolha.

```
myPath="C:\\Users\\....."
```

Seguidamente deverá seleccionar todo código até à linha **777** e correr esta selecção. Esta guarda em memória todas as funções que irão ser utilizadas pelo utilizador e inicia a importação do ficheiro de texto com os dados a ser analisados. Deverá ser-lhe pedido que seleccione o ficheiro em questão, sendo que deve escolher aquele que deseja analisar.

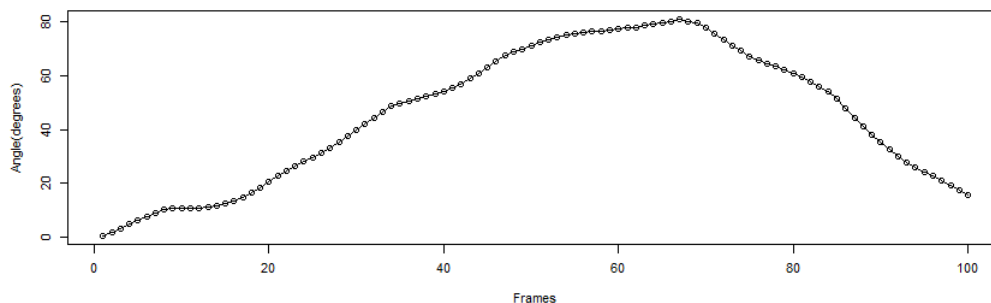
As seguintes três linhas de código irão organizar os dados. Altere o *input* das funções conforme o seu cílio:

`values2=cilia_order(values,frames,TRUE)` → o termo a **negrito** indica se o cílio é horizontal (TRUE) ou vertical (FALSE)

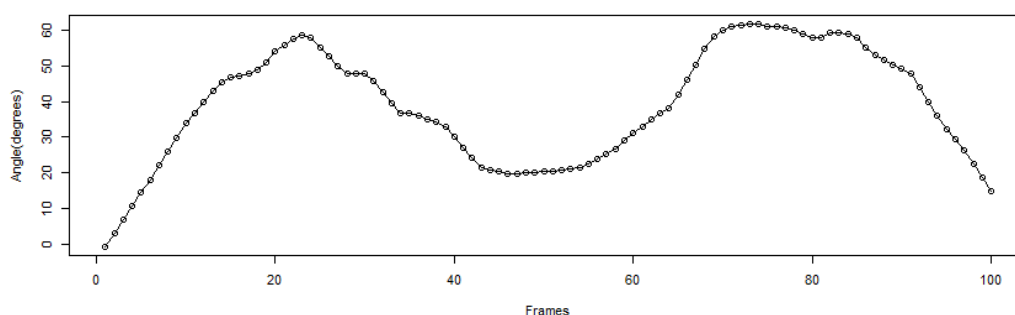
Para o passo seguinte deverá copiar as linhas **778** a **788** e corrê-las na consola.

Aqui vai ser calculado a dimensão do cílio (variável *cilsize2*), a dimensão média do cílio (variável *meansize2*), os declives das rectas (variável *slopes*), os ângulos em relação à horizontal (variável *angh*), a variação de ângulos base-meio e meio topo (variável *thetv*) e a média correspondente à variação horizontal e respectivos mínimos (variável *averageList*).

De seguida corra as linhas **789 a 801** para visualizar a média graficamente. O gráfico deverá ser semelhante a uma plataforma, não tendo ondas muito acentuadas, como se pode observar nas imagens 7 e 8.

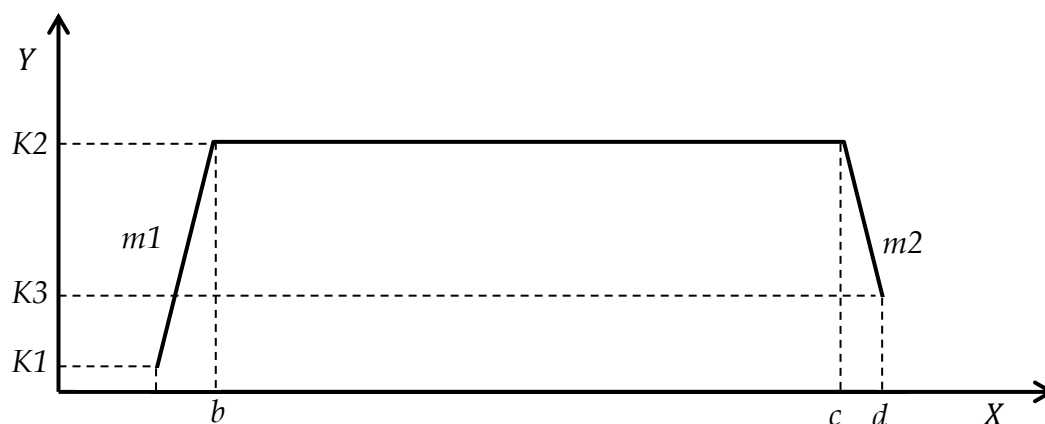


**Figura 7** – Representação de uma média correcta, com um perfil de plataforma.



**Figura 8** – Representação de uma onda incorrecta com o perfil errado.

A figura 8 representa ma onda incorrecta. Este erro deve-se à previsão incorrecta dos mínimos, provavelmente ou por erro da função *findpeaks* (importada da biblioteca *pracma*) ou devido ao movimento irregular do cílio. Caso exista algum erro semelhante vá à página 73 (Erro 1) para a sua resolução. Só continue o processo quando este se encontrar resolvido.



**Figura 9** – Modelo utilizado para parametrizar a média. Os pontos  $a$  e  $d$  são o primeiro e último ponto da média, respectivamente, e não entram na parametrização.

Com as médias já feitas, falta realizar um ajustamento para a obtenção de valores. Seleccionando as linhas 802 a 814 e correndo-as na consola, fazemos este ajustamento. Nas linhas 805,806 e 807 chamam-se as funções que darão o *fit* das curvas (figura 9).

```
fitbase=averageFit(averageList[[4]][,1],40,60,60)
fitmid=averageFit(averageList[[5]][,1],50,70,70)
fittop=averageFit(averageList[[6]][,1], 50,70,70)
```

→ `fit = averageFit (y,b,c,k2)`

Estes valores são os valores por defeito para os ajustamentos. Caso o ajustamento não se realize deverá ajustar os valores de *b*, *c* e *K2* através da observação dos gráficos da média descritos na página anterior. A figura 10 apresenta *outputs* possíveis.

```
> fitmid=averageFit(averageList[[5]][,1],50,70,70)
'data.frame': 300 obs. of 3 variables:
 $ x : int 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ...
 $ y : num 0.314 1.774 3.344 4.99 6.141 ...
 $ rep: Factor w/ 3 levels "1","2","3": 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 ...
9122.588 : 50.0000000 70.0000000 0.4261083 70.0000000 15.8298917
1862.836 : 55.399806 71.659083 -3.823022 77.400501 14.954225
1808.038 : 55.765940 71.106329 -3.790877 78.330304 14.789614
1808.037 : 55.764364 71.105234 -3.790877 78.330304 14.789614

Formula: y ~ f.pcwad(x, b, c, k1, k2, k3)

Parameters:
  Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
b 55.7644 0.3519 158.466 <2e-16 ***
c 71.1052 0.2952 240.871 <2e-16 ***
k1 -3.7909 0.3803 -9.969 <2e-16 ***
k2 78.3303 0.3573 219.209 <2e-16 ***
k3 14.7896 0.5174 28.585 <2e-16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 2.476 on 295 degrees of freedom

Number of iterations to convergence: 3
Achieved convergence tolerance: 2.877e-08
```

Ajustamento bem-sucedido com os parâmetros a serem estimados

Ajustamento mal sucedido devido a um erro de matriz não invertível.

```
> fittop=averageFit(averageList[[6]][,1], 50,70,70)
'data.frame': 300 obs. of 3 variables:
 $ x : int 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ...
 $ y : num -0.53 3.27 7.41 11.01 14.58 ...
 $ rep: Factor w/ 3 levels "1","2","3": 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 ...
191282.9 : 50.0000000 70.0000000 -0.6753062 70.0000000 14.7691966
80181.55 : 49.61853 80.40728 34.22217 34.84838 27.28862

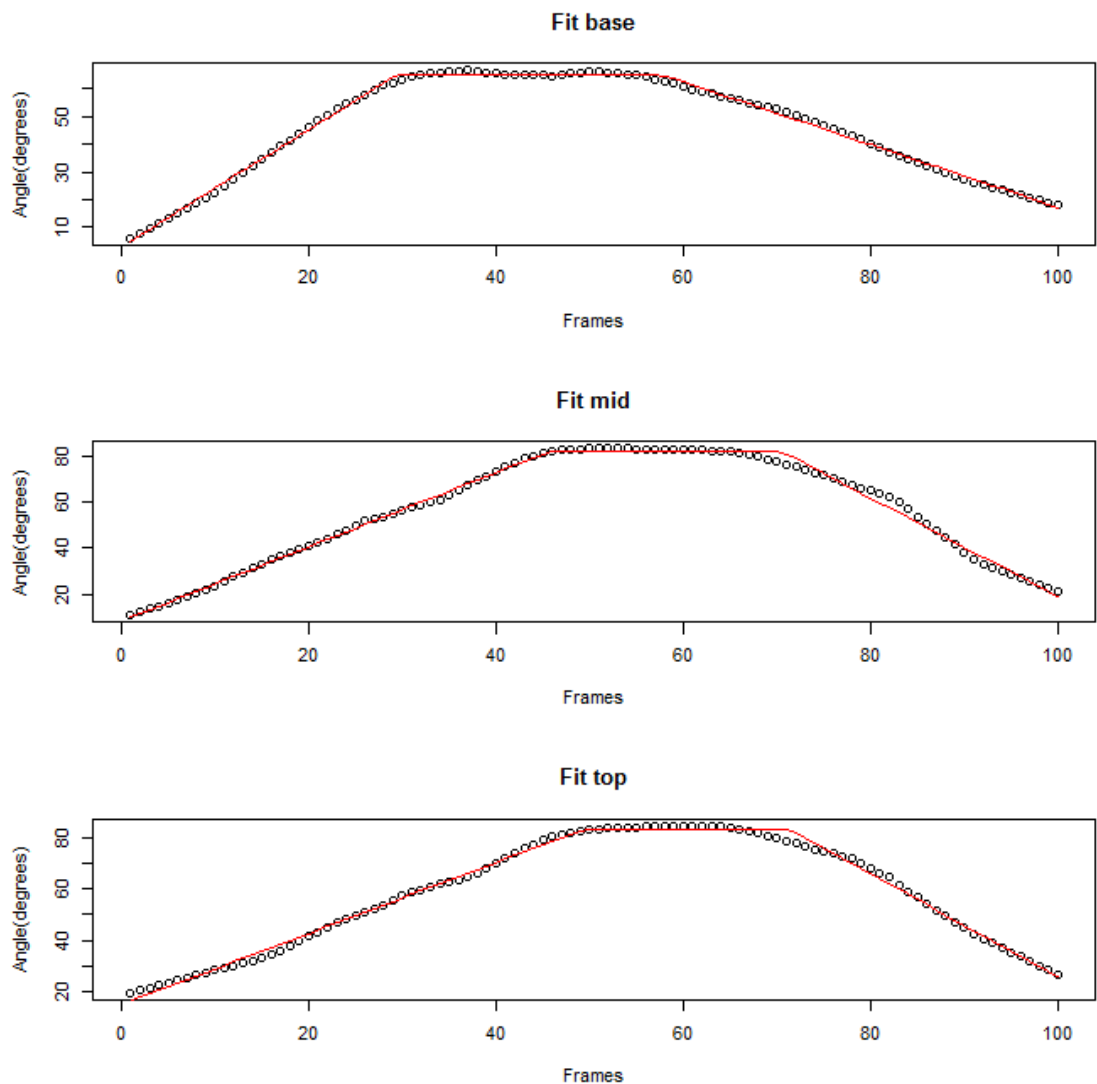
Error in nls(y ~ f.pcwad(x, b, c, k1, k2, k3), data = Data, start = list(b = bs$
singular gradient
```

Figura 10 – *Outputs* do ajustamento. Exemplo de um bem-sucedido e um mal sucedido com erro nls.

Os valores *fitbase*, *fitmid* e *fittop* terão os dados das variáveis *a*, *b*, *c*, *d*, *K1*, *K2* e *K3*.

Caso o erro não desapareça com o novo ajuste, consulte a página 74 (Erro 2) para corrigir. Só continue o processo quando este se encontrar resolvido.

Seguidamente poderá visualizar os gráficos dos ajustes, correndo as linhas de código 816 a 824. A vermelho encontra-se a curva ajustada e os pontos correspondem à média sem ajuste. (figura 11)



**Figura 11** – *Fitting* das médias para um cílio. A vermelho o *fit* e a preto o sinal da média da variação angular ao longo do tempo.

Por fim, poderá guardar os valores com as linhas **825 a 831**. Deverá mudar os nomes dos ficheiros consoante o desejado. (Em baixo, a negrito substitua a palavra **NOME** pelo nome do ficheiro)

```
save_values(values2,cilsize2,"CiliaMIDcoordinates_SORTED_NOME")
sa-
ve_plots(values2,cilsize2,angh,thetv,averageList,fitbase,fitmid,fittop,
"Cilia_movement_plots_NOME")
savetxtAng(angh,thetv,"angles_NOME")
saveAFM(averageList,fitbase,fitmid,fittop,"anglesAverages_NOME")
```

### c. Importar valores para o Excel

Com estes ficheiros, importamos para Excel os valores contidos nos ficheiros de texto. Com o Excel “Modelo Cilio” podemos analisar e visualizar melhor todos os dados obtidos.

**Nota:** todos os ficheiros de texto possuem a casa decimal marcada por um ponto “ . ”, enquanto que o Excel com as definições portuguesas as marca com uma vírgula. Utilizando a ferramenta localizar e substituir do Excel deverá mudar todas as casas para que não ocorram erros.

Abra o Excel “Modelo Cilio” e o ficheiro de texto “CiliaMIDcoordinates\_SORTED”. Os dados deste ficheiro deverão ser colocados na folha “Data” do ficheiro Excel. Imediatamente, todos os valores das folhas seguintes deverão ser automaticamente calculados pelo Excel.

Os dados do ficheiro de texto “anglesAverages” também deverão ser copiados para o Excel, neste caso para a folha “ $\Delta\theta_{Av}$  Data”.

#### **d. Análise Estatística**

É feita com recurso à função ANOVA presente no Excel, na tab Dados -> Análise de Dados.

Os valores a comparar devem estar em colunas adjacentes. O output é um sumário das duas colunas e de seguida outra secção com valores  $F$ , valor  $P$  e  $F$  crítico. Para que as duas colunas sejam consideradas iguais, o valor de  $F$  deverá ser inferior a  $F$  crítico.

### 3. Erros:

#### a. Erro 1

Primeiro, verifique quais os mínimos em falta. Vamos ter de analisar o conteúdo da função *angularAverage*. Para tal corra na consola:

```
mh=angh[[2]]
```

e de seguida todo o código das linhas 527 a 595. Para ver os mínimos corra:

```
min1  
min2  
min3
```

Por baixo de cada variável deve encontrar os mínimos. Estes devem ser verificados face à variação dos ângulos com a horizontal. Para tal, guarde os valores dos pontos organizados através do código:

```
save_values(values2,cilsize2,"CiliaMIDcoordinates_SORTED_NOME")
```

Depois prossiga como indicado na secção c, na parte referente a este documento de texto. Depois consulte no Excel quais os valores dos mínimos correctos. Caso difiram dos obtidos anteriormente, deverá alterá-los manualmente:

```
minX=c(minimo1, minimo2, minimo3,...)
```

em que *minx* é a variável a alterar. Caso falte apenas um ou dois pontos, corra este código:

```
minX=sort(c(minX,minimo1, minimo2, minimo3,...))
```

Deste modo escusa de repetir os valores que já se encontram na variável.

Copie o resto do código das linhas 595 a 697 e corra-o. Acrescente a seguinte linha:

```
averageList=results
```

Proceda com o resto do protocolo normalmente.

## b. Erro 2

Caso novos ajustes não façam desaparecer os erros no *fitting*, realiza-se um *fitting* manual. Para tal, visualize a onda da média a corrigir, a partir do código já descrito acima (789 a 801 ).

De seguida corra o código do tipo  $fit=c(b,c,k1,k2,k3)$  onde deverá alterar o valor de  $b$ ,  $c$  e  $K2$  consoante o visualizado graficamente. Corra apenas a linha correspondente à parte do cílio cujo ajuste não funcione, com as devidas alterações (preencher os valores XXXX conforme descrito):

```
#if theres an error and the fit cannot be done use your own values
#fit=c(b,c,k1,k2,k3)

fitbase=c(XXXX,XXXX,averageList[[4]][1,1],XXXX,averageList[[4]][100,1])
fitmid=c(XXXX,XXXX,averageList[[5]][1,1],XXXX,averageList[[5]][100,1])
fittop=c(XXXX,XXXX,averageList[[6]][1,1],XXXX,averageList[[6]][100,1])
```

Proceda com o resto do protocolo normalmente.



## ANEXO II Resultados: Frequências

A tabela com todos dos resultados para as frequências é a seguinte:

**Tabela 1** – Tabela com resultados da análise à frequência ciliar

Cílio	Alteração	Frequência	Wobbling	Média
A1_AB	NA	37,11	N	39,06
A2_AB	NA	41,99	N	
A3_AB	NA	42,97	N	
B1_AB_C1	NA	34,18	N	
B1_AB_C2	NA	41,99	N	
B4_AB	NA	28,32	11,72	
C1_AB	NA	41,02	N	
MovieS5	NA	44,92	N	
A2	Pkd2	28,32	N	31,98
A5_C1	Pkd2	31,25	N	
A5_C2	Pkd2	30,27	N	
A5_C3	Pkd2	34,18	N	
B1_C1	Pkd2	34,18	N	
B1_C2	Pkd2	34,18	N	
B1_C3	Pkd2	31,25	N	
B4	Pkd2	32,23	N	
E2	Arl13b	29,28	N	31,47
E1	Arl13b	27,35	N	
E4_C1	Arl13b	34,18	N	
E4_C2	Arl13b	31,25	N	
E4_C3	Arl13b	34,18	N	
E6_C1	Arl13b	30,27	N	
E6_C2	Arl13b	30,27	N	
E6_C3	Arl13b	30,27	N	
E7	Arl13b	36,13	N	
A2	DeltaD	31,25	N	37,25
A4	DeltaD	39,06	N	
A5	DeltaD	38,09	N	
A6_2_C1	DeltaD	38,09	N	
A6_2_C2	DeltaD	38,09	N	
A6_3_C1	DeltaD	37,11	N	
A6_3_C2	DeltaD	39,06	N	
Média total				34,94

### ANEXO III

### Resultados: Valores do movimento ciliar

#### Cílios normais

##### Declive $m1$

	Base	Meio	Topo
Cílio A1_AB	1,10	1,50	1,48
Cílio A2_AB	1,18	2,01	1,47
Cílio A3_AB	1,20	2,15	1,72
Cílio B1_AB_1	1,30	1,46	1,20
Cílio B1_AB_2	1,03	1,10	0,77
Cílio B4_AB	1,66	1,88	1,73
Cílio C1_AB	1,27	1,85	1,99
Cílio MovieS5	2,13	1,61	1,38
$\bar{x}$	1,36	1,70	1,47
$\sigma$	0,34	0,32	0,35
$\sigma^2$	0,12	0,10	0,12

##### Declive $m2$

	Base	Meio	Topo
Cílio A1_AB	-1,08	-2,19	-2,15
Cílio A2_AB	-1,58	-1,42	-1,65
Cílio A3_AB	-1,58	-1,42	-1,64
Cílio B1_AB_1	-1,45	-1,23	-0,99
Cílio B1_AB_2	-1,25	-1,26	-0,97
Cílio B4_AB	-0,89	-1,11	-1,26
Cílio C1_AB	-0,47	-1,27	-1,28
Cílio MovieS5	-1,14	-2,13	-1,98
$\bar{x}$	-1,18	-1,50	-1,49
$\sigma$	0,35	0,39	0,41
$\sigma^2$	0,13	0,15	0,17

##### Tempo de subida

	Base	Meio	Topo
Cílio A1_AB	53,88	54,81	51,57
Cílio A2_AB	58,19	32,06	47,62
Cílio A3_AB	57,86	31,31	42,89
Cílio B1_AB_1	38,25	44,25	42,26
Cílio B1_AB_2	48,18	36,54	54,00
Cílio B4_AB	34,00	34,73	27,51
Cílio C1_AB	35,94	37,50	31,53
Cílio MovieS5	28,48	44,76	48,42
$\bar{x}$	44,35	39,50	43,22
$\sigma$	10,88	7,44	8,78
$\sigma^2$	118,29	55,31	77,09

### Tempo de Descida

	Base	Meio	Topo
Cilio A1_AB	42,52	28,94	28,06
Cilio A2_AB	26,73	40,70	36,57
Cilio A3_AB	30,39	32,78	26,06
Cilio B1_AB_1	31,14	45,13	39,87
Cilio B1_AB_2	35,47	35,14	36,00
Cilio B4_AB	55,00	47,68	32,36
Cilio C1_AB	63,00	44,67	38,23
Cilio MovieS5	42,57	29,57	28,89
$\bar{x}$	40,85	38,08	33,25
$\sigma$	11,88	6,94	4,82
$\sigma^2$	141,07	48,12	23,20

### Tempo de Plateau

	Base	Meio	Topo
Cilio A1_AB	2,60	15,25	19,38
Cilio A2_AB	14,08	26,24	14,82
Cilio A3_AB	14,41	27,04	20,64
Cilio B1_AB_1	29,61	9,62	16,87
Cilio B1_AB_2	15,35	27,33	9,00
Cilio B4_AB	10,00	16,59	39,14
Cilio C1_AB	0,07	16,83	29,24
Cilio MovieS5	27,95	24,67	21,69
$\bar{x}$	14,26	20,44	21,35
$\sigma$	9,87	6,27	8,65
$\sigma^2$	97,46	39,31	74,79

### Amplitude

	Base	Meio	Topo
Cilio A1_AB	64,52	78,35	71,17
Cilio A2_AB	69,60	67,24	76,04
Cilio A3_AB	69,61	67,22	73,94
Cilio B1_AB_1	66,27	72,92	64,64
Cilio B1_AB_2	62,86	55,89	39,44
Cilio B4_AB	65,00	66,83	68,59
Cilio C1_AB	63,00	44,67	38,23
Cilio MovieS5	65,41	82,22	83,28
$\bar{x}$	65,78	66,92	64,42
$\sigma$	2,45	11,28	15,63
$\sigma^2$	6,02	127,21	244,26

## Cílios Pkd2

### Declive *m1*

	Base	Meio	Topo
Cílio A2	2,50	1,85	1,78
Cílio A5 1	2,79	2,76	1,88
Cílio A5 2	1,67	1,93	0,96
Cílio A5 3	1,58	2,30	1,51
Cílio B1 1	1,12	1,61	1,25
Cílio B1 2	1,31	1,65	1,30
Cílio B1 3	1,16	1,94	1,73
Cílio B4	1,18	2,15	1,61
$\bar{x}$	1,67	2,03	1,50
$\sigma$	0,60	0,35	0,29
$\sigma^2$	0,36	0,12	0,08

### Declive *m2*

	Base	Meio	Topo
Cílio A2	-1,41	-1,87	-2,00
Cílio A5 1	-1,09	-1,52	-1,63
Cílio A5 2	-1,30	-1,92	-3,34
Cílio A5 3	-1,71	-2,44	-1,89
Cílio B1 1	-0,80	-1,30	-1,62
Cílio B1 2	-1,41	-2,22	-1,56
Cílio B1 3	-1,10	-1,80	-1,52
Cílio B4	-1,07	-1,43	-2,26
$\bar{x}$	-1,24	-1,81	-1,98
$\sigma$	0,26	0,37	0,57
$\sigma^2$	0,07	0,13	0,32

### Tempo de subida

	Base	Meio	Topo
Cílio A2	30,62	37,51	41,41
Cílio A5 1	29,66	34,03	35,51
Cílio A5 2	41,61	37,71	55,26
Cílio A5 3	44,48	35,48	49,05
Cílio B1 1	38,73	38,75	49,84
Cílio B1 2	49,35	51,39	46,62
Cílio B1 3	44,37	40,56	34,75
Cílio B4	48,78	38,78	45,67
$\bar{x}$	40,95	39,27	44,77
$\sigma$	7,03	4,95	6,67
$\sigma^2$	49,44	24,54	44,47

### Tempo de Descida

	Base	Meio	Topo
Cilio A2	52,11	32,84	36,93
Cilio A5 1	65,42	50,61	35,30
Cilio A5 2	51,03	32,36	16,89
Cilio A5 3	42,50	28,33	27,85
Cilio B1 1	47,01	40,86	36,48
Cilio B1 2	46,13	30,77	39,79
Cilio B1 3	43,88	39,72	39,34
Cilio B4	44,24	41,28	23,74
$\bar{x}$	49,04	37,10	32,04
$\sigma$	6,95	6,88	7,77
$\sigma^2$	48,34	47,31	60,42

### Tempo de Plateau

	Base	Meio	Topo
Cilio A2	16,27	28,66	20,66
Cilio A5 1	3,92	14,36	28,19
Cilio A5 2	6,36	28,93	26,85
Cilio A5 3	12,02	35,19	22,09
Cilio B1 1	13,26	19,40	12,68
Cilio B1 2	3,51	16,84	12,59
Cilio B1 3	10,75	18,72	24,91
Cilio B4	5,98	18,95	29,59
$\bar{x}$	9,01	22,63	22,20
$\sigma$	4,40	6,85	6,17
$\sigma^2$	19,39	46,87	38,10

### Amplitude

	Base	Meio	Topo
Cilio A2	79,20	74,92	86,76
Cilio A5 1	86,00	92,55	85,02
Cilio A5 2	68,56	65,84	84,07
Cilio A5 3	78,32	74,76	77,38
Cilio B1 1	53,79	61,50	62,52
Cilio B1 2	69,81	74,15	73,55
Cilio B1 3	56,09	72,31	65,98
Cilio B4	60,09	76,62	81,37
$\bar{x}$	68,98	74,08	77,08
$\sigma$	10,95	8,50	8,46
$\sigma^2$	119,79	72,22	71,49

## Cílios Arl13b

### Declive *m1*

	Base	Meio	Topo
Cílio E1	1,28	1,52	2,00
Cílio E2	1,26	1,97	1,85
Cílio E4 1	3,04	1,92	1,73
Cílio E4 2	1,69	1,81	1,65
Cílio E4 3	1,37	1,28	1,37
Cílio E6 1	1,06	1,91	1,05
Cílio E6 2	2,02	1,91	1,92
Cílio E6 3	1,52	1,92	2,35
Cílio E7	1,06	1,77	1,42
$\bar{x}$	1,59	1,78	1,71
$\sigma$	0,59	0,22	0,36
$\sigma^2$	1,28	1,52	2,00

### Declive *m2*

	Base	Meio	Topo
Cílio E1	-0,47	-1,74	-1,90
Cílio E2	-1,06	-1,30	-2,30
Cílio E4 1	-2,00	-1,82	-1,94
Cílio E4 2	-1,45	-1,58	-1,38
Cílio E4 3	-2,30	-3,78	-2,16
Cílio E6 1	-1,61	-2,00	-3,02
Cílio E6 2	-1,05	-1,15	-1,63
Cílio E6 3	-1,79	-3,26	-2,55
Cílio E7	-1,18	-1,58	-1,81
$\bar{x}$	-1,43	-2,02	-2,08
$\sigma$	0,53	0,84	0,47
$\sigma^2$	-0,47	-1,74	-1,90

### Tempo de subida

	Base	Meio	Topo
Cílio E1	35,93	53,12	39,16
Cílio E2	38,20	37,42	37,99
Cílio E4 1	25,05	41,74	36,32
Cílio E4 2	41,86	40,31	43,63
Cílio E4 3	60,82	72,00	56,77
Cílio E6 1	51,76	46,03	51,78
Cílio E6 2	29,57	42,66	39,99
Cílio E6 3	42,52	50,33	44,70
Cílio E7	49,00	37,67	52,37
$\bar{x}$	41,63	46,81	44,75
$\sigma$	10,49	10,24	6,86
$\sigma^2$	35,93	53,12	39,16

### Tempo de Descida

	Base	Meio	Topo
Cilio E1	62,86	41,44	34,43
Cilio E2	39,52	39,24	21,18
Cilio E4 1	42,30	32,40	30,81
Cilio E4 2	39,72	38,19	45,47
Cilio E4 3	30,78	15,00	34,78
Cilio E6 1	35,26	35,19	10,53
Cilio E6 2	50,61	48,66	31,77
Cilio E6 3	33,02	24,47	38,35
Cilio E7	33,74	39,99	27,76
$\bar{x}$	40,87	34,95	30,56
$\sigma$	9,60	9,42	9,51
$\sigma^2$	62,86	41,44	34,43

### Tempo de Plateau

	Base	Meio	Topo
Cilio E1	0,20	4,44	25,41
Cilio E2	21,28	22,35	39,83
Cilio E4 1	31,65	24,87	31,87
Cilio E4 2	17,42	20,50	9,89
Cilio E4 3	7,40	12,00	7,45
Cilio E6 1	11,99	17,78	36,69
Cilio E6 2	18,82	7,67	27,24
Cilio E6 3	23,45	24,19	16,79
Cilio E7	16,26	21,34	18,87
$\bar{x}$	16,50	17,24	23,78
$\sigma$	8,66	7,02	10,73
$\sigma^2$	0,20	4,44	25,41

### Amplitude

	Base	Meio	Topo
Cilio E1	68,58	122,20	113,49
Cilio E2	60,81	79,93	87,87
Cilio E4 1	93,41	86,23	68,70
Cilio E4 2	78,28	77,16	72,88
Cilio E4 3	106,24	98,00	92,23
Cilio E6 1	60,33	81,42	72,21
Cilio E6 2	67,05	77,56	69,61
Cilio E6 3	79,19	91,53	99,81
Cilio E7	72,88	80,76	81,70
$\bar{x}$	76,31	88,31	84,28
$\sigma$	14,35	13,63	14,57
$\sigma^2$	68,58	122,20	113,49

## Cílios DeltaD

### Declive $m1$

	Base	Meio	Topo
Cílio A2	1,86	2,05	2,31
Cílio A4	1,69	2,13	1,96
Cílio A5	0,97	1,35	1,15
Cílio 2A6 1	1,32	1,23	1,20
Cílio 2A6 2	0,79	1,45	1,34
Cílio 3A6 1	1,33	1,46	1,13
Cílio 3A6 2	1,33	1,23	0,46
$\bar{x}$	1,33	1,56	1,36
$\sigma$	0,35	0,35	0,56
$\sigma^2$	0,12	0,12	0,31

### Declive $m2$

	Base	Meio	Topo
Cílio A2	-1,19	-1,21	-1,82
Cílio A4	-1,29	-2,28	-1,60
Cílio A5	-0,93	-2,34	-1,55
Cílio 2A6 1	-0,96	-2,14	-1,49
Cílio 2A6 2	-0,98	-1,29	-1,97
Cílio 3A6 1	-1,22	-1,33	-1,40
Cílio 3A6 2	-1,62	-1,41	-0,67
$\bar{x}$	-1,17	-1,71	-1,50
$\sigma$	0,23	0,47	0,38
$\sigma^2$	0,05	0,22	0,15

### Tempo de subida

	Base	Meio	Topo
Cílio A2	32,21	36,28	25,57
Cílio A4	32,45	39,24	34,10
Cílio A5	40,83	57,43	62,85
Cílio 2A6 1	34,68	44,53	45,61
Cílio 2A6 2	57,98	45,44	46,55
Cílio 3A6 1	42,95	48,54	36,84
Cílio 3A6 2	45,27	60,45	53,33
$\bar{x}$	40,91	47,42	43,55
$\sigma$	8,46	8,24	11,58
$\sigma^2$	71,53	67,82	134,16



### Tempo de Descida

	Base	Meio	Topo
Cilio A2	42,27	46,63	17,44
Cilio A4	38,40	24,08	30,39
Cilio A5	39,14	25,64	29,55
Cilio 2A6 1	42,61	17,38	22,99
Cilio 2A6 2	30,51	39,22	29,30
Cilio 3A6 1	40,48	31,66	21,84
Cilio 3A6 2	37,41	33,50	22,98
$\bar{x}$	38,69	31,16	24,93
$\sigma$	3,78	9,11	4,53
$\sigma^2$	14,31	82,95	20,49

### Tempo de Plateau

	Base	Meio	Topo
Cilio A2	24,52	16,09	55,99
Cilio A4	28,15	35,69	34,51
Cilio A5	19,03	15,92	6,60
Cilio 2A6 1	21,71	37,09	30,39
Cilio 2A6 2	10,50	14,33	23,15
Cilio 3A6 1	15,57	18,80	40,32
Cilio 3A6 2	16,32	5,05	22,69
$\bar{x}$	19,40	20,42	30,52
$\sigma$	5,50	10,86	14,39
$\sigma^2$	30,23	117,97	206,94

### Amplitude

	Base	Meio	Topo
Cilio A2	74,31	102,27	95,74
Cilio A4	59,43	58,29	50,39
Cilio A5	53,57	75,00	80,58
Cilio 2A6 1	62,97	74,19	74,41
Cilio 2A6 2	53,94	70,02	65,56
Cilio 3A6 1	73,34	89,59	85,13
Cilio 3A6 2	73,69	72,35	41,95
$\bar{x}$	64,46	77,39	70,54
$\sigma$	8,60	13,25	17,77
$\sigma^2$	73,97	175,47	315,92

## ANEXO IV Resultados: ANOVA

### Frequências

#### Normais/Pkd2 ( $\alpha=0.05$ )

##### SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Freq Normais	8	312,4999	39,06249	30,5175
Freq Pkd2	8	255,8594	31,98242	4,564013

##### ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	200,5094	1	200,5094	11,43106	0,004479	4,60011
Dentro de grupos	245,5706	14	17,54076			
Total	446,08	15				

#### Normais/Arl13b ( $\alpha=0.05$ )

##### SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Freq Normais	8	312,4999	39,06249	30,5175
Freq Arl13b	9	283,2131	31,46813	7,804534

##### ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	244,2679	1	244,2679	13,2726	0,002403	4,543077
Dentro de grupos	276,0588	15	18,40392			
Total	520,3267	16				

#### Normais/DeltaD ( $\alpha=0.05$ )

##### SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Freq Normais	8	312,4999	39,06249	30,5175
Freq DeltaD	7	260,7422	37,24888	7,447742

##### ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	12,27954	1	12,27954	0,617997	0,445886	4,667193
Dentro de grupos	258,309	13	19,86992			
Total	270,5885	14				

### $\Delta t1$ - Normais/Pkd2 ( $\alpha=0.05$ )

SUMÁRIO						
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Normal	54	-153	-2,83333	2,59434		
Pkd2	47	-82	-1,74468	2,846438		
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	29,78165157	1	29,78165	10,98356	0,001285	3,937117
Dentro de grupos	268,4361702	99	2,711476			
Total	298,2178218	100				

### $\Delta t1$ - Normais/Arl13b ( $\alpha=0.05$ )

SUMÁRIO						
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Normal	54	-153	-2,833333333	2,594339623		
Arl13b	53	-132	-2,490566038	2,831640058		
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	3,142567	1	3,142567448	1,158823699	0,284177	3,93155641
Dentro de grupos	284,7453	105	2,711859838			
Total	287,8879	106				

### $\Delta t1$ - Normais/DeltaD ( $\alpha=0.05$ )

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Normal	54	-153	-2,83333	2,59434		
DeltaD	46	-121	-2,63043	2,282609		
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	1,022608696	1	1,022609	0,417187	0,519853	3,938111
Dentro de grupos	240,2173913	98	2,451198			
Total	241,24	99				

### $\Delta t_2$ - Normais/Pkd2 ( $\alpha=0.05$ )

SUMÁRIO						
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Normal	54	-254	-4,7037	4,778477		
Pkd2	47	-122	-2,59574	3,506938		
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	111,6592156	1	111,6592	26,66386	1,25E-06	3,937117
Dentro de grupos	414,5784082	99	4,187661			
Total	526,2376238	100				

### $\Delta t_2$ - Normais/Arl13b ( $\alpha=0.05$ )

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Normal	54	-254	-4,703703704	4,77847659		
Arl13b	53	-249	-4,698113208	3,176342525		
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,000836	1	0,000835962	0,000209775	0,988472	3,93155641
Dentro de grupos	418,4291	105	3,985038767			
Total	418,4299	106				

### $\Delta t_2$ - Normais/DeltaD ( $\alpha=0.05$ )

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Normal	54	-254	-4,7037	4,778477		
DeltaD	46	-226	-4,91304	3,103382		
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	1,088566828	1	1,088567	0,27151	0,603496	3,938111
Dentro de grupos	392,9114332	98	4,0093			
Total	394	99				

### Declive m1 - Normais/Pkd2

#### **Base ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,37523	1	0,37523	1,383374	0,25914	4,60011
Dentro de grupos	3,797393	14	0,271242			
Total	4,172623	15				

#### **Meio ( $\alpha=0.10$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,434673	1	0,434673	3,394222	0,086703	3,102213
Dentro de grupos	1,792878	14	0,128063			
Total	2,227551	15				

#### **Topo ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,004553	1	0,004553	0,038813	0,846651	4,60011
Dentro de grupos	1,642367	14	0,117312			
Total	1,64692	15				

### Declive m1 - Normais/Arl13b ( $\alpha=0.05$ )

#### **Base ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,225819	1	0,225819	0,835825	0,375056	4,543077
Dentro de grupos	4,052617	15	0,270174			
Total	4,278435	16				

#### **Meio ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,030128	1	0,030128	0,364844	0,554854	4,543077
Dentro de grupos	1,238679	15	0,082579			
Total	1,268808	16				

#### **Topo ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,32652	1	0,32652	2,369958	0,144517	4,543077
Dentro de grupos	2,066617	15	0,137774			
Total	2,393136	16				

### Declive m1 - Normais/DeltaD ( $\alpha=0.05$ )

#### **Base ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,003609	1	0,003609	0,02661	0,872928	4,667193
Dentro de grupos	1,762894	13	0,135607			
Total	1,766502	14				

#### **Meio ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,072331	1	0,072331	0,565751	0,465354	4,667193
Dentro de grupos	1,662037	13	0,127849			
Total	1,734368	14				

#### **Topo ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,042026	1	0,042026	0,173263	0,684018	4,667193
Dentro de grupos	3,153199	13	0,242554			
Total	3,195225	14				

### Declive m2 - Normais/Pkd2 ( $\alpha=0.05$ )

#### **Base ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,012745	1	0,012745	0,114748	0,739829	4,60011
Dentro de grupos	1,555005	14	0,111072			
Total	1,567751	15				

#### **Meio ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,375012	1	0,375012	2,278145	0,153444	4,60011
Dentro de grupos	2,304583	14	0,164613			
Total	2,679595	15				

#### **Topo ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,956176	1	0,956176	3,413978	0,085883	4,60011
Dentro de grupos	3,921075	14	0,280077			
Total	4,877251	15				

### Declive m2 – Normais/Arl13b ( $\alpha=0.05$ )

#### **Base ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,271602	1	0,271602	1,163882	0,297705	4,543077
Dentro de grupos	3,50038	15	0,233359			
Total	3,771982	16				

#### **Meio ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,143864	1	1,143864	2,248889	0,154462	4,543077
Dentro de grupos	7,629528	15	0,508635			
Total	8,773392	16				

#### **Topo ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,453739	1	1,453739	6,590928	0,02145	4,543077
Dentro de grupos	3,308499	15	0,220567			
Total	4,762237	16				

### Declive m2 – Normais/DeltaD ( $\alpha=0.05$ )

#### **Base ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,000448	1	0,000448	0,004277	0,948849	4,667193
Dentro de grupos	1,362949	13	0,104842			
Total	1,363398	14				

#### **Meio ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,165476	1	0,165476	0,771165	0,395797	4,667193
Dentro de grupos	2,789534	13	0,21458			
Total	2,95501	14				

#### **Topo ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,000436	1	0,000436	0,002398	0,961691	4,667193
Dentro de grupos	2,362212	13	0,181709			
Total	2,362648	14				

### Tempo de subida - Normais/Pkd2 ( $\alpha=0.05$ )

#### Base ( $\alpha=0.05$ )

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	46,12936	1	46,12936	0,48128	0,499193	4,60011
Dentro de grupos	1341,861	14	95,84723			
Total	1387,991	15				

#### Meio ( $\alpha=0.05$ )

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,197958	1	0,197958	0,004338	0,948416	4,60011
Dentro de grupos	638,8334	14	45,63096			
Total	639,0314	15				

#### Topo ( $\alpha=0.05$ )

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	9,498031	1	9,498031	0,13674	0,717077	4,60011
Dentro de grupos	972,4438	14	69,46027			
Total	981,9418	15				

### Tempo de subida - Normais/Arl13b ( $\alpha=0.05$ )

#### Base ( $\alpha=0.05$ )

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	31,15365	1	31,15365	0,241276	0,630395	4,543077
Dentro de grupos	1936,803	15	129,1202			
Total	1967,957	16				

#### Meio ( $\alpha=0.05$ )

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	226,475	1	226,475	2,449683	0,138398	4,543077
Dentro de grupos	1386,761	15	92,45076			
Total	1613,236	16				

#### Topo ( $\alpha=0.05$ )

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,844296	1	0,844296	0,012071	0,913971	4,543077
Dentro de grupos	1049,186	15	69,94571			
Total	1050,03	16				



**Tempo de subida - Normais/DeltaD ( $\alpha=0.05$ )**

**Base ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	44,09162	1	44,09162	0,396111	0,540008	4,667193
Dentro de grupos	1447,047	13	111,3113			
Total	1491,139	14				

**Meio ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	234,2675	1	234,2675	3,320167	0,091512	4,667193
Dentro de grupos	917,2663	13	70,55894			
Total	1151,534	14				

**Topo ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,391561	1	0,391561	0,003272	0,955256	4,667193
Dentro de grupos	1555,782	13	119,6756			
Total	1556,174	14				

**Tempo de descida- Normais/Pkd2 ( $\alpha=0.05$ )**

**Base ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	268,2186	1	268,2186	2,478223	0,137754	4,60011
Dentro de grupos	1515,223	14	108,2302			
Total	1783,441	15				

**Meio ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3,838837	1	3,838837	0,070398	0,794624	4,60011
Dentro de grupos	763,4216	14	54,53011			
Total	767,2604	15				

**Topo ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	5,892368	1	5,892368	0,123312	0,730699	4,60011
Dentro de grupos	668,9816	14	47,7844			
Total	674,874	15				

### Tempo de descida - Normais/Arl13b ( $\alpha=0.05$ )

#### **Base ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,001034	1	0,001034	7,92E-06	0,997792	4,543077
Dentro de grupos	1958,185	15	130,5457			
Total	1958,186	16				

#### **Meio ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	41,33037	1	41,33037	0,523751	0,480381	4,543077
Dentro de grupos	1183,683	15	78,91219			
Total	1225,013	16				

#### **Topo ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	12,65196	1	12,65196	0,186436	0,672042	4,543077
Dentro de grupos	1017,934	15	67,86229			
Total	1030,586	16				

### Tempo de descida - Normais/DeltaD ( $\alpha=0.05$ )

#### **Base ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	17,45991	1	17,45991	0,184731	0,674377	4,667193
Dentro de grupos	1228,7	13	94,51538			
Total	1246,16	14				

#### **Meio ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	178,5808	1	178,5808	2,404254	0,145001	4,667193
Dentro de grupos	965,6015	13	74,27704			
Total	1144,182	14				

#### **Topo ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	258,5919	1	258,5919	10,21638	0,007017	4,667193
Dentro de grupos	329,0494	13	25,31149			
Total	587,6414	14				

**Tempo de plateau- Normais/Pkd2 ( $\alpha=0.05$ )**

**Base ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	110,2208	1	110,2208	1,650593	0,219729	4,60011
Dentro de grupos	934,8706	14	66,77647			
Total	1045,091	15				

**Meio ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	19,10509	1	19,10509	0,387938	0,543398	4,60011
Dentro de grupos	689,4689	14	49,24778			
Total	708,574	15				

**Topo ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2,884291	1	2,884291	0,044715	0,835576	4,60011
Dentro de grupos	903,0555	14	64,50397			
Total	905,9398	15				

**Tempo de plateau - Normais/Arl13b ( $\alpha=0.05$ )**

**Base ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	21,21948	1	21,21948	0,218699	0,646755	4,543077
Dentro de grupos	1455,389	15	97,02595			
Total	1476,609	16				

**Meio ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	43,53489	1	43,53489	0,861975	0,367886	4,543077
Dentro de grupos	757,5896	15	50,50597			
Total	801,1245	16				

**Topo ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	46,83984	1	46,83984	0,435504	0,519306	4,543077
Dentro de grupos	1613,297	15	107,5532			
Total	1660,137	16				

### Tempo de plateau - Normais/DeltaD ( $\alpha=0.05$ )

#### **Base ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	98,73481	1	98,73481	1,294812	0,275701	4,667193
Dentro de grupos	991,3044	13	76,25419			
Total	1090,039	14				

#### **Meio ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,001794	1	0,001794	2,05E-05	0,99646	4,667193
Dentro de grupos	1140,278	13	87,71367			
Total	1140,28	14				

#### **Topo ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	351,6584	1	351,6584	2,398846	0,143729	4,60011
Dentro de grupos	2052,328	14	146,5948			
Total	2403,986	15				

### Amplitude- Normais/Pkd2 ( $\alpha=0.05$ )

#### **Base ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	40,96698	1	40,96698	0,569833	0,462836	4,60011
Dentro de grupos	1006,501	14	71,89295			
Total	1047,468	15				

#### **Meio ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	205,2293	1	205,2293	1,800841	0,200971	4,60011
Dentro de grupos	1595,482	14	113,963			
Total	1800,711	15				

#### **Topo ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	641,6553	1	641,6553	3,556251	0,080243	4,60011
Dentro de grupos	2526,023	14	180,4302			
Total	3167,679	15				

### Amplitude - Normais/Arl13b ( $\alpha=0.05$ )

#### **Base ( $\alpha=0.10$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	469,1423	1	469,1423	3,700594	0,073583	3,073186
Dentro de grupos	1901,623	15	126,7749			
Total	2370,765	16				

#### **Meio ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1937,773	1	1937,773	10,80706	0,004986	4,543077
Dentro de grupos	2689,594	15	179,3063			
Total	4627,367	16				

#### **Topo ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1412,429	1	1412,429	5,138279	0,038622	4,543077
Dentro de grupos	4123,255	15	274,8837			
Total	5535,684	16				

### Amplitude - Normais/DeltaD ( $\alpha=0.05$ )

#### **Base ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	6,512682	1	6,512682	0,149608	0,705167	4,667193
Dentro de grupos	565,9098	13	43,53152			
Total	572,4225	14				

#### **Meio ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	409,0578	1	409,0578	2,367705	0,147848	4,667193
Dentro de grupos	2245,952	13	172,7655			
Total	2655,01	14				

#### **Topo ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	139,7709	1	139,7709	0,436199	0,520495	4,667193
Dentro de grupos	4165,584	13	320,4295			
Total	4305,355	14				

**Amplitude (Meio/Base) - Normais/Pkd2 ( $\alpha=0.05$ )**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,02079	1	0,02079	0,822867	0,379692	4,60011
Dentro de grupos	0,353721	14	0,025266			
Total	0,374512	15				

**Amplitude (Meio/Base) - Normais/Arl13b ( $\alpha=0.05$ )**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,125846	1	0,125846	2,345714	0,146444	4,543077
Dentro de grupos	0,804739	15	0,053649			
Total	0,930584672	16				

**Amplitude (Meio/Base) - Normais/DeltaD ( $\alpha=0.05$ )**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,174731	1	0,174731	6,337278	0,027038	4,747225
Dentro de grupos	0,330864	12	0,027572			
Total	0,505595	13				

**Amplitude (Topo/Meio) - Normais/Pkd2 ( $\alpha=0.05$ )**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,034714	1	0,034714	1,997489	0,179408	4,60011
Dentro de grupos	0,243302	14	0,017379			
Total	0,278015957	15				

**Amplitude (Topo/Meio) - Normais/Arl13b ( $\alpha=0.05$ )**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	1,58E-05	1	1,58E-05	0,001099	0,973986	4,543077
Dentro de grupos	0,215608	15	0,014374			
Total	0,215624	16				

**Amplitude (Topo/Meio) - Normais/DeltaD ( $\alpha=0.05$ )**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,005177	1	0,005177	0,218113	0,648848	4,747225
Dentro de grupos	0,284805	12	0,023734			
Total	0,289982	13				

**Variância  $\Theta$  1 - Normais/Pkd2 ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Normais	8	2345,753	293,2192	17737		
Pkd2	8	1554,425	194,3032	5594,523		
ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	39137,49	1	39137,49	3,354902	0,088363	4,60011
Dentro de grupos	163320,7	14	11665,76			
Total	202458,2	15				

**Variância  $\Theta$  1 - Normais/Arl13b ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Normais	8	2345,753	293,2192	17737		
Arl13b	9	2387,494	265,2771	7492,471		
ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3306,743	1	3306,743	0,269427	0,61129	4,543077
Dentro de grupos	184098,8	15	12273,25			
Total	187405,5	16				

**Variância  $\Theta$  1 - Normais/DeltaD ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Normais	8	2345,753	293,2192	17737		
DeltaD	7	2272,277	324,6109	14216,38		
ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3678,989	1	3678,989	0,228337	0,640694	4,667193
Dentro de grupos	209457,3	13	16112,1			
Total	213136,3	14				

**Variância  $\Theta$  2 - Normais/Pkd2 ( $\alpha=0.05$ )**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Normais	8	2050,674	256,3343	12567,44		
Pkd2	8	1094,718	136,8398	2340,225		
ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	57115,77	1	57115,77	7,662607	0,015097	4,60011
Dentro de grupos	104353,6	14	7453,831			
Total	161469,4	15				

**Variância  $\Theta$  2 - Normais/Arl13b ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Normais	8	2050,674	256,3343	12567,44		
Arl13b	9	2101,826	233,5362	3492,431		
ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2201,298	1	2201,298	0,284868	0,601349	4,543077
Dentro de grupos	115911,5	15	7727,433			
Total	118112,8	16				

**Variância  $\Theta$  2 - Normais/DeltaD ( $\alpha=0.05$ )**

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Normais	8	2050,674	256,3343	12567,44		
DeltaD	7	1950,369	278,6242	7302,8		
ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1854,863	1	1854,863	0,182969	0,675835	4,667193
Dentro de grupos	131788,9	13	10137,6			
Total	133643,7	14				